

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JOSÉ ADEMAR VILLANOVA JUNIOR

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM
RATOS SUBMETIDOS À LESÃO MEDULAR COMPRESSIVA, COM E SEM
TRATAMENTO COM CORTICOIDE**

CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JOSÉ ADEMAR VILLANOVA JUNIOR

**TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM
RATOS SUBMETIDOS À LESÃO MEDULAR COMPRESSIVA, COM E SEM
TRATAMENTO COM CORTICOIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dr^a. Rosangela Locatelli Dittrich.

Coorientadora: Dr^a Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto.

CURITIBA

2013


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

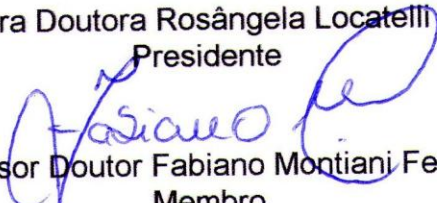


PARECER

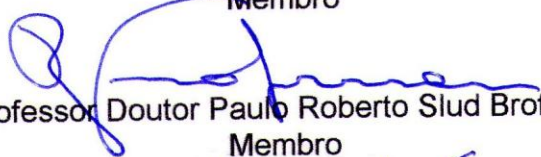
A Comissão Examinadora da Defesa da Tese intitulada “**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO MEDULAR COMPRESSIVA, COM E SEM TRATAMENTO COM CORTICÓIDE**” apresentada pelo Doutorando **JOSÉ ADEMAR VILLANOVA JUNIOR** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato aprovado para receber o Título de Doutor em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 30 de abril de 2013


Professora Doutora Rosângela Locatelli Dittrich
Presidente


Professor Doutor Fabiano Montiani Ferreira
Membro


Professor Doutor Peterson Triches Dornbusch
Membro


Professor Doutor Paulo Roberto Slud Brofman
Membro


Professor Doutor Ricardo Junqueira Del Carlo
Membro

Dedicatória

À minha mãezinha Clotilde e ao meu tio Gerson, que tão precocemente partiram para outro plano, dedico também à minha esposa Rebeca, meu pai José, minha tia Ana e ao meu irmão Jomar. Guardo-os no coração do meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado entre muitas bençãos, pais amorosos, um irmão digno de apreço, familiares queridos, uma esposa maravilhosa, saúde, boa formação educacional, princípios cristãos e a graça de ser médico veterinário, cirurgião e docente.

À minha mãezinha Clotilde Wisneski Lopes Villanova, que partiu tão cedo, por ter me dado educação, valores morais, exemplo de bondade, tolerância, amizade e o entendimento de quão importante é construir e manter uma família unida. Sei que tudo que ela fez visava a prática do bem, suas ações foram fundamentadas no amor incondicional, acredito sem hesitação que haverá o nosso reencontro e este dia será o grande dia.

Ao meu pai José Ademar Villanova, por ter sido um pai amoroso, justo, trabalhador, honesto, verdadeiramente patriota e muito preocupado com minha formação pessoal e profissional. Sei que nunca mediu esforços para me educar e me ver feliz.

À minha Tia Ana Cristina Sekulic, por ter sido amorosa, dando-me amor materno. Reconheço e agradeço sobremaneira todos os cuidados a mim dispensados, em todos os meus sucessos há a sua parcela de contribuição.

Ao meu Tio Gerson Luiz Sekulic que tão precocemente partiu fisicamente, está guardado em minhas lembranças e no meu coração. Sempre o tive como um pai, admirei-o por sua inteligência, educação, ponderação, resignação e refinamento. Agradeço o exemplo, o amor e a influência em muitas das minhas preferências.

Ao meu irmão Jomar Villanova. Graças a ele percebo o quão bom e importante é ter um irmão. Sempre foi amigo, exemplo de homem e de fé cristã. Ele é indubitavelmente o maior presente que nossos pais poderiam ter me dado.

À minha amada esposa Rebeca Bacchi Villanova, companheira, conselheira e que faz a minha vida ter mais sentido e ser mais feliz.

Aos meus familiares que muito me amam, que tanto me fizeram e me fazem feliz. Para os que partiram fica a certeza do reencontro com risos, beijos e abraços.

À minha sogra Clarita de Jesus Bacchi e ao seu esposo Lino Tasso Ravaglio Junior, pelo carinho, amizade e estímulo em importantes etapas de minha vida.

À minha afilhadinha Heloísa Ravaglio por sua pureza, carinho e alegria.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Rosangela Locatelli Dittrich, pela orientação, pela amizade, por estar sempre disposta a ajudar, ouvir e ensinar, pessoa-árvore que, frondosa, abriga ética e comprometimento, com competência, se envolve em tudo que a vida acadêmica requer de gente honrada. Agradeço sobremaneira o seu aceite em me orientar, e sua participação na construção desta Tese.

À minha coorientadora Doutora Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto, pelo exemplo de dedicação e da incessante busca pela excelência nas pesquisas científicas.

Ao Prof. Dr. Antonio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk, por tanto ter me influenciado em minha vida profissional. Exemplo de homem, cirurgião e professor.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman agradeço a excelente acolhida no laboratório que coordena e o exemplo de dedicação e persistência. Agradeço também pelo encorajamento no estudo de células-tronco.

Às pesquisadoras Letícia Fracaro, Alexandra Justino da Silva e Fabiana Barchiki e ao pesquisador Luiz Guilherme Capriglione pelos momentos de dedicação e companheirismo. Sem eles a realização desta Tese não seria possível.

Ao Prof. Dr. Sérgio Adriane Bezerra de Moura pela interpretação das lâminas de histopatologia.

À Ana Paula Ressetti Abud e Alejandro Correa pela transdução das células-tronco.

À Ana Paula Camargo Martins do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, coordenado pela Prof^a Dr^a Lúcia Noronha, pela feitura das lâminas de histopatologia.

À minha madrinha Prof^a Dr^a Antonia Maria Binder do Prado, pelos ensinamentos científicos, conselhos cristãos e carinho dispensado. Ensinou-me que os fatos não podem ser apenas vistos pelos olhos e interpretados pelo cérebro, eles precisam ser analisados pelo coração.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, de quem me orgulho de fazer parte do seu legado. Sinto muito pela precoce partida física, pois há pessoas como ele, que deviam ser eternas. Meu mais profundo agradecimento pela paciência e exemplo de pesquisador de notório saber. Agradeço a acolhida desde a iniciação científica.

À Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Alcântara, pelos ensinamentos, pela influência na afeição à Neurologia Veterinária e pelo despertar de uma fé reveladora.

À Prof^a Dr^a Irvênia Santis Prada, pelo exemplo de dedicação aos estudos, à pesquisa, à afeição contagiadora pela Neurologia e pelo amor aos animais.

À Prof^a Dr^a Rosana Keller Richter pelos ensinamentos em Cirurgia Veterinária e por acreditar no meu potencial. Agradeço os estímulos, conselhos e provas constantes de sincera amizade.

O meu mais profundo agradecimento à Diretora do Curso de Medicina Veterinária da PUCPR, Prof^a Dr^a Cláudia Turra Pimpão, pelas análises estatísticas, apoio, estímulo e exemplo de retidão e dedicação a tudo que se compromete fazer.

Um agradecimento especial ao Prof. Rodrigo Távora Mira, a quem carinhosamente chamo de “Capitão”. Pessoa de notória polidez e que traz

consigo as palavras certas aos mais variados momentos. Agradeço os conselhos, o exemplo e as oportunidades.

À Prof^a Dr^a Juliany Gomes Quitzan pela amizade e por ter participado tão ativamente da rotina cirúrgica da Unidade Hospitalar para Animais de Companhia da PUCPR durante o período que precisei me ausentar para a realização dos experimentos desta tese.

Aos Docentes e Residentes da Unidade Hospitalar para Animais de Companhia da PUCPR, pela amizade, construção conjunta de conhecimento e busca incessante de primazia em todas as atividades.

Aos alunos da graduação pelo estímulo constante pela busca do saber. Apraz-me poder dividir conhecimentos e experiências acumuladas com o tempo.

Ao Sr. Elias Pires por manter o Biotério sempre agradável e a Sr^a Carmen Lucia Costa por manter o Laboratório de Técnica Operatória em condições de uso. Agradeço também o auxílio no experimento.

À Universidade Federal do Paraná pela acolhida, pelos ensinamentos, pela possibilidade de fazer grandes amigos e pelo orgulho de ter sido seu aluno de Pós-graduação.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por tudo que fez e faz por mim, desde a Graduação até a minha formação pessoal e profissional continuada. É com muita honra e alegria que afirmo nela ter graduado e que pertenço a seu quadro docente desde 2002.

À Fundação Araucária – Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Governo do Estado do Paraná pelo apoio financeiro.

Aos animais de companhia, uma das minhas razões de alegria cotidiana, e aos animais de laboratório por oportunizar o rápido avanço da ciência e por nos fazer entender e admirar o quanto a máquina orgânica é complexa e quão maior ela é se comparada ao entendimento humano.

**“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo
começo, qualquer um pode começar agora e fazer um
novo fim” (Francisco Cândido Xavier).**

RESUMO

O trauma constitui uma causa relevante de mortalidade no mundo, atinge principalmente a população jovem, economicamente ativa, e leva muitas vezes a sequelas incapacitantes. O tratamento convencional após o trauma é a utilização de corticoide, que nem sempre apresenta resultado satisfatório. As células-tronco têm sido utilizadas em vários ensaios pré-clínicos de lesão medular e são consideradas uma alternativa promissora. A interrupção da fase inflamatória e a utilização da terapia celular como tratamento conjunto mostram-se como possibilidades de aperfeiçoar o tratamento no reparo da lesão, antes das degenerações parenquimatosa e neuronal. Uma terapia alternativa é o transplante de células-tronco derivadas do tecido adiposo no local da lesão, devido ao seu potencial imunossupressor e atuação no reparo tecidual. Neste estudo objetivou-se padronizar um modelo de lesão medular, que produza paraplegia, com o uso de cateter e avaliar histologicamente a efetividade da lesão para estudos com terapia celular. Foram realizadas as lesões medulares em ratos Wistar utilizando-se o cateter Fogarty nº 3 e compressão na região toracolombar (T8) durante 5 minutos. Foram estudados três grupos: grupo A, animais controle sem lesão medular; grupos B e C com lesão medular induzida por preenchimento do balão do cateter com 50 µL e 80 µL respectivamente de solução salina. Conclui-se que o procedimento realizado utilizando-se 80 µL de solução salina para preencher o balão do cateter, apesar de maior mortalidade, foi mais eficiente, pois apresentou um grupo homogêneo e com maior porcentagem de animais com lesão completa (paraplegia). Em seguida, foram avaliados os efeitos dos transplantes das células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (CTDAh) em ratos Wistar com lesão medular compressiva. As CTDAh foram cultivadas entre a terceira e quinta passagens. Parte das células foram transduzidas utilizando vetores lentivirais da luciferase, para o rastreamento *in vivo*. A lesão medular nos ratos foi realizada após laminectomia em T10 e introdução do cateter Fogarty nº 3 no espaço epidural, o *cuff* localizado em T8 foi preenchido com 80 µL de solução salina por 5 minutos. Os animais foram aleatoriamente separados em três grupos experimentais com 21 ratos em cada grupo. Grupo controle (A): animais que receberam aplicações de meio de cultura (50 µL); grupo células-tronco (B): receberam duas aplicações de CTDAh sete e 14 dias pós-lesão; grupo

corticoide e células-tronco (C): animais tratados com 30mg/kg de succinato sódico de metilprednisolona (SSMP) três horas após a lesão e duas aplicações de CTDAh sete e 14 dias pós-lesão. As infusões de células ou meio de cultura foram realizadas no espaço epidural. A localização e sobrevivência das CTDAh foram avaliadas por imagens de bioluminescência *in vivo* em animais dos grupos B e C. O esvaziamento vesical foi efetuado diariamente, em média a cada seis horas, durante três meses. As avaliações motoras iniciaram 24h após a lesão medular, sendo repetidas diariamente até três meses pós-lesão, utilizando a escala de Basso-Beattie-Bresneham (BBB). Após este período os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica, em seguida foram realizadas coletas de bexiga urinária e medula espinhal para análises histopatológicas. As análises de bioluminescência revelaram a presença das CTDAh no local da lesão. Em relação à incontinência urinária e a motricidade, todos os animais do grupo A mantiveram o estado de enurese e paraplegia pós-compressão medular, enquanto que parte dos animais dos grupos B e C recuperaram a continência urinária e parcialmente a motricidade. Os grupos B e C apresentaram diferença estatística na continência urinária e motricidade quando comparados ao grupo A. A recuperação da continência urinária nos grupos B e C ocorreu, em média, nove dias após o segundo transplante. O início da recuperação parcial da motricidade no Grupo B ocorreu, em média, após 11 dias do segundo transplante, o melhor escore (mediana de 5,5) da escala motora de BBB deste grupo ocorreu, em média, após 21 dias do segundo transplante. No grupo C o início da recuperação parcial da motricidade ocorreu, em média, nove dias após o segundo transplante, o melhor escore (mediana de 5,0) da escala motora de BBB ocorreu, em média, após 17 dias do segundo transplante. As amostras de bexiga urinária dos grupos A, B e C mostraram aparência histológica normal. O grau de collagenização na parede vesical foi diferente entre os grupos, na região do colo vesical (região A) não ocorreu diferença significativa entre os grupos A e B, mas ocorreu diferença significativa quando o Grupo C foi comparado aos grupos A e B. Na região do corpo da bexiga (região B) não ocorreu diferença significativa entre os grupos A e B, e B e C, mas ocorreu, diferença significativa entre os Grupos A e C. Em relação à espessura da parede vesical, não houve diferença significativa entre os grupos A, B e C. As análises histológicas medulares revelaram menor percentual de tecido lesado e maior concentração de neurópilos nas medulas espinhais dos animais dos grupos B e C. Em relação às áreas medulares, não houve diferença

significativa entre os grupos A, B e C. Concluiu-se que o uso de CTDAh associado ou não ao SSMP contribuiu positivamente para a melhora clínica e preservação de tecido nervoso após lesão medular compressiva em ratos Wistar. O esvaziamento manual impediu alterações histológicas na bexiga urinária. A associação das células ao corticoide, não demonstrou ser um tratamento mais eficiente comparativamente ao transplante isolado de CTDAh.

Palavras chave: modelo de lesão medular; corticoterapia, terapia celular, imagem de bioluminescência, recuperação miccional, recuperação motora, rato Wistar.

ABSTRACT

Trauma is a major cause of mortality worldwide, affecting mainly the young population, economically active, and often leads to disabling sequelae. Conventional treatment after trauma is the use of corticosteroids, which has not always satisfactory results. Stem cells have been used in several pre-clinical trials for spinal cord injury and are considered a promising alternative. The interruption of the inflammatory phase and the use of cell therapy as a treatment group are shown as possibilities to optimize treatment to repair the damage before the parenchymal and neuronal degeneration. An alternative therapy is the transplantation of stem cells derived from adipose tissue at the injury site due to its immunosuppressive potential and role in tissue repair. This study aimed to standardize a model of spinal cord injury, producing paraplegia, with the catheter and histologically evaluate the effectiveness of the lesion for studies of cell therapy. Spinal cord injury were performed in rats using the Fogarty catheter n° 3, and compression in the thoracolumbar region (T8) for 5 minutes. We studied three groups: group A, control animals without spinal cord injury groups B and C with spinal cord injury induced by balloon catheter filled with 50 μ L and 80 μ L of saline respectively. It is concluded that the procedure performed using 80 μ L of saline solution to fill the balloon catheter, although higher mortality was more efficient, because it showed a homogeneous group and greater percentage of animals with complete injury (paraplegia). Then, we evaluated the effects of transplantation of stem cells derived from human adipose tissue (CTDAh) in rats with spinal cord compression. The CTDAh were grown between the third and fifth passages. Part of the cells were transduced using lentiviral vectors luciferase for in vivo tracking. Spinal cord injury in rats after laminectomy was performed at T10, and introduction of a Fogarty catheter n° 3 in the epidural space, the cuff located at T8 was filled with 80 μ L of saline for 5 minutes. The animals were randomly divided into three groups with 21 rats in each group. Control group (A): animals that received injections of culture medium (50 μ L); stem cell group (B) received two applications CTDAh seven and 14 days post-injury; corticosteroid group and stem cells (C): animals treated with 30mg/kg of methylprednisolone sodium succinate (SSMP) three hours after the injury, and two applications of CTDAh seven and 14 days post-injury. The infusion of cells or culture medium were performed in the epidural space. The

location and survival of CTDAh were assessed by in vivo bioluminescence images of animals in groups B and C. The bladder emptying was performed daily on average every six hours for three months. Performance tests began 24 hours after spinal cord injuries, repeated daily until three months post-injury, using the scale of Basso-Beattie-Bresneham (BBB). After this period the animals were euthanized by anesthetic overdose then were collected from the urinary bladder and spinal cord to histopathological analysis. The bioluminescence analysis revealed the presence of CTDAh at the site of injury. Regarding urinary incontinence and motility, all animals in group A remained the state of enuresis and paraplegia after spinal cord compression, while the animals in groups B and C recovered urinary continence and partly motor. Groups B and C showed no statistical difference in urinary continence and motor function when compared to group A. The recovery of urinary continence in groups B and C occurred on average nine days after the second transplantation. The start of partial recovery of motor function in Group B took place on average after 11 days from the transplantation, the better score (median 5,5) of the motor scale BBB of this group report was on average 21 days after the second transplantation . In group C the beginning of the partial recovery of motor function occurred on average nine days after the transplantation, the best score (median 5,0) of the motor scale BBB report occurred on average at 17 days after the second transplantation. Urinary bladder samples from groups A, B and C showed normal histological appearance. The degree of collagen in the bladder wall was different between groups in the region of the bladder neck (region A) no significant difference between groups A and B, but significant difference when group C was compared to groups A and B. In the region of the body from the bladder (region B) there was no significant difference between groups A and B, and B and C, but there was a significant difference between Groups A and C. Regarding the thickness of the bladder wall, there was no significant difference between groups A, B and C. Histological analysis revealed a lower percentage of spinal cord injured tissue and greater concentration neuropils in the spinal cords of animals in groups B and C. Regarding medullary areas, there was no significant difference between groups A, B and C. It was concluded that the use of CTDAh with or without the SSMP contributed positively to clinical improvement and preservation of nervous tissue after spinal cord compression in rats. The manual emptying prevented histological changes in the urinary bladder. The association of

cells to corticosteroids, it proved to be a more efficient compared to the transplantation of isolated CTDAh.

Keywords: spinal cord injury model; corticosteroid therapy, cell therapy, bioluminescence imaging, voiding recovery, motor recovery, Wistar rat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1- Imagens macroscópicas das medulas espinhais de animais dos Grupos A, B e C.	43
Figura 2.2- Corte histológico do epicentro da compressão medular de animal do Grupo A.	43
Figura 2.3- Corte histológico do epicentro da compressão medular de animal do Grupo B.	44
Figura 2.4- Corte histológico do epicentro da compressão medular de animal do Grupo C.	44
Figura 2.5- Imagens macroscópicas dos pulmões e corações de ratos dos Grupos A, B e C.	45
Figura 2.6- Corte histológico de pulmão de rato Wistar do Grupo C após compressão de medula espinhal.	45
Figura 3.1- Indução do trauma medular.	64
Figura 3.2- Transplante de CTDAh no espaço epidural.	66
Figura 3.3- Estrutura do IVIS® Lumina II System. Processamento de imagem baseado em Bioluminescência.	67
Figura 3.4- Rato Wistar com lesão medular mantido sob anestesia após transplante de CTDAh com células marcadas. Equipamento IVIS Lumina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA), utilizado para avaliação pós-transplante das CTDAh <i>in vivo</i> por meio de bioluminescência.	68
Figura 3.5- Imagem representativa da Injeção de luciferina por via intraperitoneal em rato Wistar com lesão medular após transplante das CTDAh transduzidas.	69
Figura 3.6- Imagem da espessura da região A (colo vesical) da parede vesical de rato submetido à trauma medular. Espessura aferida com o uso do <i>Software</i> IMAGE PRO-PLUS.	71
Figura 3.7- Imagem da área de medula espinhal de rato submetido à trauma medular. Área aferida com o uso do <i>Software</i> IMAGE PRO-PLUS.	72

Figura 3.8- Imagem representativa de rato Wistar com epistaxe e hemoptise pós-lesão medular. Aspecto macroscópico do edema pulmonar neurogênico pós-lesão medular.	74
Figura 3.9- Avaliação motora e da continência urinária em ratos submetidos à trauma medular, após duas aplicações de meio de cultura (Grupo A), ou duas aplicações de células-tronco (Grupo B), ou uma aplicação de corticoide associada a duas aplicações de células-tronco (Grupo C).	75
Figura 3.10- Sinal de bioluminescência das CTDAh transduzidas.	77
Figura 3.11- Imagens dos sinais de bioluminescência. Gráficos demonstrando a média da contagem de fótons/segundo.	78
Figura 3.12- Imagem de bioluminescência nos pulmões.	79
Figura 3.13- Análise do sinal de bioluminescência da medula espinhal de um animal do Grupo C que foi a óbito no 16º dia após lesão medular.	80
Figura 3.14- Resultados referentes à emissão do fluxo total (fótons/segundo) dos Grupos B e C após o primeiro transplante de células transduzidas. ...	80
Figura 3.15- Resultados referentes à emissão do fluxo total (fótons/segundo) dos Grupos B e C após o segundo transplante de células transduzidas. ..	81
Figura 3. 16- Resultados referentes à emissão do fluxo total (fótons/segundo) após o 1º e 2º transplantes nos animais que receberam células transduzidas do Grupo B.	81
Figura 3.17- Resultados referentes à emissão do fluxo total (fótons/segundo) após o 1º e 2º transplantes nos animais que receberam células transduzidas do Grupo C.	81
Figura 3.18- Aspecto histológico de corte transversal de bexiga urinária de rato submetido à lesão medular, pertencente ao Grupo A (Controle).	83
Figura 3.19- Aspecto histológico de corte transversal de bexiga urinária de rato submetido à lesão medular, pertencente ao Grupo B (Grupo células-tronco).	83
Figura 3.20- Aspecto histológico de corte transversal de bexiga urinária de rato submetido à lesão medular, pertencente ao Grupo C (Grupo corticoterapia e células-tronco).	84
Figura 3.21- Resultados referentes aos graus de colagenização da região A da bexiga urinária de ratos submetidos à trauma medular dos Grupos A (grupo controle); Grupo B (Grupo células-tronco) e Grupo C (Grupo	

corticoterapia e células-tronco). Teste de Kruskal-Wallis, com posterior teste de Dunn's.	85
Figura 3.22- Resultados referentes aos graus de colagenização da região B da bexiga urinária de ratos submetidos à trauma medular dos Grupos A (grupo controle); Grupo B (Grupo células-tronco) e Grupo C (Grupo corticoterapia e células-tronco). Teste de Kruskal-Wallis, com posterior teste de Dunn's.	85
Figura 3.23- Resultados referentes às espessuras das regiões A e B das bexigas urinárias de ratos submetidos à trauma medular dos Grupos A (grupo controle); Grupo B (Grupo células-tronco) e Grupo C (Grupo corticoterapia e células-tronco). Para análise dos dados de espessura da bexiga foi utilizado ANOVA (one-way) seguido de teste de Bonferroni. ($\alpha=0,05$).	86
Figura 3.24- Corte histológico de medula espinhal de rato submetido à trauma medular.	87
Figura 3.25- Aspecto histológico de corte transversal do epicentro da lesão medular de animal pertencente ao Grupo A.	88
Figura 3.26- Aspecto histológico de corte transversal do epicentro da lesão medular de animal pertencente ao Grupo B.	89
Figura 3.27- Aspecto histológico de corte transversal do epicentro da lesão medular de animal pertencente ao Grupo C.	90
Figura 3.28- Resultados referentes às áreas medulares de ratos submetidos à trauma medular dos Grupos A (grupo controle); Grupo B (Grupo células-tronco) e Grupo C (Grupo corticoterapia e células-tronco). ..	91

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1- Resultados referentes aos escores obtidos pelos animais, na Escala BBB, nos diversos momentos avaliados neste estudo.42
- Tabela 3.1- Avaliação motora utilizando a escala BBB (Basso et al., 1995) ao longo de 90 dias de análise de ratos submetidos à trauma medular, após duas aplicações de meio de cultura (Grupo A), ou duas aplicações de células-tronco (Grupo B), ou uma aplicação de corticoide associada a duas aplicações de células-tronco (Grupo C).76
- Tabela 3.2- Avaliação por bioluminescência do fluxo total (fótons/segundo) de ratos submetidos à trauma medular e duas aplicações de células-tronco (Grupo B), ou uma aplicação de corticoide associada a duas aplicações de células-tronco (Grupo C).77

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ASIA	<i>American Spinal Injury Association</i>
BBB	escala de Basso, Beattie e Bresnahan
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
cm²	centímetro quadrado
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CTDA	células-tronco derivadas de tecido adiposo
CTDAh	células-tronco derivadas de tecido adiposo humano
CTM	célula-tronco mesenquimal
CTMh	células-tronco mesenquimal humana
CTM-MO	célula-tronco derivada de medula óssea
DMEM	<i>Dulbeccos's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
<i>g</i>	símbolo da aceleração da gravidade
h	hora
HE	hematoxilina-eosina
HEK 293	linhagem celular embrionária derivada de rim
IM	intramuscular
IFN-γ	interferon gama
IL-1α	interleucina 1 alfa
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-10	interleucina 10
IP	intraperitonal
Kg	quilograma
L1	primeira vértebra lombar
LM	lesão medular
mg	miligrama
mL	mililitro
MO	medula óssea
NASCIS	<i>National Acute Spinal Cord Injury Study</i>

NGF	fator de crescimento neural
NMS	neurônio motor superior
PBS	salina tamponada com fosfato
pH	potencial hidrogeniônico
SC	subcutâneo
SSMP	succinato sódico de metilprednisolona
TA	tecido adiposo
TM	tricroômio de Masson
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
T8	oitava vértebra torácica
T10	décima vértebra torácica
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
μL	microlitro
μM	micrometro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
1.1	REFERÊNCIAS	29
2	PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR ..	35
2.1	STANDARDIZATION OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF SPINAL CORD INJURY	36
2.2	INTRODUÇÃO.....	37
2.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.3.1	Animais	38
2.3.2	Indução do trauma medular	38
2.3.3	Grupos	40
2.3.4	Avaliação motora pós-lesão.....	40
2.3.5	Eutanásia e necropsia dos animais	40
2.3.6	Análises histopatológicas de secções de medula espinhal, pulmões, fígado e rins	41
2.3.7	Análise estatística	41
2.4	RESULTADOS.....	41
2.4.1	Avaliação motora pós-lesão.....	41
2.4.2	Aspectos macroscópicos e microscópicos da zona de medula espinhal lesionada.....	42
2.4.3	Mortalidade durante e após compressão medular	44
2.4.4	Análises histopatológicas dos pulmões, fígado e rins dos animais que foram a óbito durante ou após compressão medular	45
2.5	DISCUSSÃO.....	46
2.6	CONCLUSÃO	48

2.7 REFERÊNCIAS	49
3 RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DA MICÇÃO E DA MOTRICIDADE APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HETERÓLOGAS EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO MEDULAR COMPRESSIVA, SUBMETIDOS OU NÃO AO TRATAMENTO COM CORTICOIDE	51
3.1 FUNCTIONAL RECOVERY OF MOTOR FUNCTION AND URINATION AFTER TRANSPLANTATION OF HETEROLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS IN RATS SUBJECTED TO SPINAL CORD COMPRESSION, TREATED OR NOT TREATED WITH CORTICOSTEROIDS	53
3.2 INTRODUÇÃO.....	55
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3.3.1 Animais	60
3.3.2 Isolamento e cultivo das CTDAh	61
3.3.3 Viabilidade das CTDAh	62
3.3.4 Transdução das CTDAh.....	62
3.3.5 Imagem por bioluminescência – Imagem <i>in vitro</i>	63
3.3.6 Indução do trauma medular	63
3.3.7 Cuidados pós-lesão medular	65
3.3.8 Avaliação do padrão miccional	65
3.3.9 Avaliação motora dos membros pélvicos.....	65
3.3.10 Transplante das CTDAh no espaço epidural	66
3.3.11 Imagem por bioluminescência – Imagem <i>in vivo</i>	67
3.3.12 Eutanásia dos animais.....	69
3.3.13 Análise histológica da bexiga urinária e da medula espinhal.....	69
3.3.14 Análises estatísticas.....	73

3.4 RESULTADOS.....	73
3.4 .1 Viabilidade das CTDAh	73
3.4.2 Mortalidade durante e após lesão medular	73
3.4.3 Avaliação do padrão miccional	74
3.4.4 Avaliação motora dos membros pélvicos	75
3.4.5 Avaliação pós-transplante das CTDAh por bioluminescência	76
3.4.6 Avaliação histológica da bexiga urinária	82
3.4.6.1 Imagem histopatológica da bexiga urinária	82
3.4.6.2 Graus de colagenização da parede vesical	84
3.4.6.3 Aferição da espessura da parede vesical	86
3.4.7 Avaliação histológica da medula espinhal.....	86
3.4.7.1 Imagem histopatológica da medula espinhal	86
3.4.7.2 Aferição da área medular	90
3.5 DISCUSSÃO	91
3.6 CONCLUSÃO	100
3.7 REFERÊNCIAS	101
ANEXOS	113

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular (LM) é a lesão traumática aguda de elementos neurais do canal medular (medula e cauda equina), resultando em deficiência motora e/ou sensorial, temporária ou permanente (*National Spinal Cord Injury Database* 2013). A LM é uma das mais devastadoras entre as lesões que afetam o ser humano (CARVALHO et al., 2007). A lesão de origem traumática é incapacitante e representa grande impacto na sociedade e grave problema de saúde pública (CAMPOS et al., 2008). A LM acomete mundialmente cerca de 2,5 milhões de pessoas (SCHWAB et al., 2006), e a violência está nitidamente ligada a estes dados estatísticos, porém a etiologia do trauma medular varia em função da atividade desenvolvida (FAULKNER et al., 2010). A maioria das vítimas é jovem, saudável e sofrerá incapacidade por longo tempo, pois não existe tratamento efetivo (SAKANAKA et al. 2006; FITZMAURICE, 2011).

A LM ocorre em cerca de 15 a 20% das fraturas da coluna vertebral (RABEH e CALIRI, 2010). Na Europa, a incidência anual de novos casos é de 10 a 30 novos casos por milhão de habitantes. Nos Estados Unidos, varia de 27 a 83 por milhão, dos quais mais de 80% são homens (McDONALD et al., 2003; WYNDAELE e WYNDAELE, 2006). No Brasil, a estimativa é de 40 novos casos por milhão de habitantes por ano (RABEH e CALIRI, 2010). Estima-se que mais de 130.000 indivíduos sofram lesão medular a cada ano no mundo (SOBANI et al., 2010).

A maior incidência de LM está entre os adultos jovens (BERG et al., 2011), e a média de idade dos indivíduos é de 37,6 anos, sendo a causa mais frequente o acidente automobilístico (50,4%). As quedas (23,8%), a violência (11,2%) e

acidentes durante a prática de esportes (9%) também estão entre as causas mais comuns (HO et al., 2007). A localização anatômica está diretamente relacionada ao mecanismo de trauma, sendo a região cervical o segmento mais atingido (DEFINO, 1999; VIALLE et al., 2007; VASCONCELOS e RIBERTO, 2011). Segundo Vialle et al. (2007) e Vasconcelos e Riberto (2011) não há variação sazonal na incidência do trauma em coluna vertebral e na maior parte das vezes não há lesão nervosa. Para eles quando a LM ocorre, a principal manifestação é a paraplegia.

Segundo Custódio et al. (2009) a expectativa de vida é semelhante a de um indivíduo normal, com taxas de morbidades relacionadas à deficiência cada vez mais baixas. Porém, como ainda não há tratamento efetivo para restaurar funções perdidas pela medula comprometida, a reabilitação e readaptação com auxílio de uma equipe interdisciplinar se tornaram fases obrigatórias do tratamento da LM (VASCONCELOS e RIBERTO, 2011).

Cronicamente, as maiores causas de morbidade e de mortalidade após LM são complicações decorrentes da perda direta dos controles esfinterianos (vesical e anal), perda de sensibilidade com formação de escaras e processos osteoarticulares como escoliose, artropatias e osteoporose (VIALLE et al., 2001; MEYER et al., 2003). Durante as três primeiras semanas após o trauma, a maioria dos pacientes sofre alterações tromboembólicas, não necessariamente sintomáticas, sendo estas a maior causa no atraso da reabilitação. Outros fatores importantes são as alterações no relacionamento psicossocial, pois depressão, uso de drogas e suicídio são elevados em relação a população em geral. Nos pacientes tetraplégicos, somam-se ainda as alterações da função pulmonar e perda da termorregulação (POYNTON et al., 1997; VIALLE et al., 2002).

Embora não se tenha o controle sobre o trauma inicial à medula espinhal, o tratamento clínico e/ou cirúrgico pode influenciar a sobrevivência neuronal pela interrupção dos eventos subsequentes ao trauma. O tempo para se iniciar o tratamento é fundamental na determinação do prognóstico e a presença de percepção da dor não garante a recuperação neurológica completa. Não existe cura farmacológica para danos à medula espinhal (FITZMAURICE, 2011).

A progressão dos danos teciduais à medula espinhal está quase concluída em 48 horas, preconizando-se que o tratamento, para ser efetivo, deve ser instituído dentro desse prazo. Os resultados terapêuticos serão variáveis e a abordagem primária visa à contenção de danos (SHARP e WHEELER, 2005; TOOMBS e WATERS, 2007).

Apesar do grande avanço nas pesquisas, poucos instrumentos estão disponíveis e acessíveis para a simulação da LM. Essa deficiência na disponibilidade de equipamentos e metodologias se deve, principalmente, aos custos elevados e dificuldade de adaptação de materiais aos vários tamanhos de modelos animais (CUNNINGHAM et al., 2005).

Segundo Rodrigues et al. (2010) os métodos atuais para avaliação das alterações fisiopatológicas da LM em humanos são limitados e as causas das lesões são multifatoriais, portanto há necessidade de modelos animais, que diferem das lesões ocorridas em humanos, tanto no mecanismo, quanto topográfica e anatomicamente, e quanto à energia do trauma, mas mesmo assim são fontes ricas e importantes de informações. Padronizar um modelo animal de LM é fundamental para o desenvolvimento de terapias experimentais (RODRIGUES et al., 2010; NETTO et al., 2010).

Várias pesquisas que apresentaram resultados aplicáveis ao ser humano foram realizadas em animais em etapa pré-clínica. Pesquisadores admitem que o melhor animal experimental é o rato, e que a única forma de comparar resultados é a partir de lesões padronizadas e em grande número de espécimes (NOBLE e WRATHALL, 1985; FALCONER et al., 1996; CARVALHO et al., 2007).

Há décadas os corticoides têm sido testados como protetores neuronais no trauma. Estudos multicêntricos coordenados pela *American Spinal Injury Association* (ASIA) e *National Acute Spinal Cord Injury Studies* (NASCIS) revelaram resultados promissores com o uso do succinato sódico de metilprednisolona (SSMP). Porém, várias críticas às metodologias foram publicadas (BOTELHO et al., 2009; FITZMAURICE, 2011).

A partir do início do século XXI, com o advento de novos conhecimentos sobre a plasticidade das células-tronco e com o surgimento de estudos científicos que sugeriram a transdiferenciação direta e diferenciação dessas células, estas passaram a ter seu emprego considerado na terapia celular (MEIRELLES et al., 2006). Atualmente, a possibilidade de terapia com células-tronco conquistou notoriedade e tornou-se mais uma alternativa (LAI et al., 2008).

As células-tronco possuem capacidade de autorenovação e podem se diferenciar em múltiplas linhagens celulares (KORBLING e ESTROV, 2003; PITTENGER e MARTIN, 2004). As células-tronco mesenquimais (CTM) representam uma população de células-tronco somáticas que podem ser isoladas, expandidas em cultura e caracterizadas *in vitro* e *in vivo* (PITTENGER e MARTIN, 2004; REBELATTO, et al., 2008). Tem como funções a manutenção e renovação de tecidos adultos (CAPLAN e DENNIS, 2006).

Além do potencial de diferenciação, as CTM secretam fatores bioativos que protegem e reparam o tecido danificado (CAPLAN, 2009), e possuem baixa imunogenicidade, podendo ser utilizadas de forma alogênica sem provocar rejeição (MINGUELL et al., 2000; PITTENGER e MARTIN, 2004). Também podem ter efeito imunossupressor no local da lesão, pois reprimem a vigilância imunológica e inibem a destruição mediada pelas células T e B no sítio danificado (KOLOSSOV et al., 2005).

As CTM podem ser obtidas de diferentes fontes (NÖTH et al., 2002; SABATINI et al., 2005; SHI et al., 2005; CRIGLER L et al., 2007), como por exemplo o tecido adiposo. As vantagens são a fácil obtenção e a quantidade elevada de células (DE UGARTE et al., 2003; MUSINA, et al., 2005).

Baseando-se na função das CTM de renovação de tecidos adultos, por meio da diferenciação celular ou a liberação de fatores bioativos que atuam de forma parácrina, espera-se que as células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (CTDAh), quando transplantadas em animais com lesão medular, sejam capazes de regenerar o tecido, inclusive com recuperação funcional. Apesar das evidências científicas favoráveis ao uso de células-tronco em doenças neurológicas, espera-se avanços nessa área (PAULA et al., 2005; PEREIRA, 2008). O uso de células-tronco humanas em ratos com lesão medular revelou migração de células para o local lesionado (PAL et al. 2010) e redução da reação inflamatória (PARK et al. 2010).

As células transplantadas podem ser rastreadas com auxílio da transdução destas com vetores específicos. A utilização da imagem de bioluminescência *in vivo* facilita a análise das células transplantadas em modelos de lesão e possibilita a avaliação da efetividade dos tratamentos (LUO et al., 2008; KIM et al., 2012; ROET et al. 2012).

A presente tese foi dividida em dois capítulos com os seguintes títulos: (1) Padronização de um modelo experimental de lesão medular; (2) Recuperação funcional da micção e da motricidade após transplante de células-tronco mesenquimais heterólogas em ratos submetidos à lesão medular compressiva, submetidos ou não ao tratamento com corticoide.

No primeiro capítulo os objetivos foram padronizar um modelo de lesão medular compressivo simples, econômico, eficaz, reprodutível e capaz de provocar paraplegia sem melhora espontânea e progressiva e avaliar histologicamente a efetividade da lesão para estudos com terapia celular e suas possíveis implicações. No segundo capítulo os objetivos foram: monitorar *in vivo*, por meio de imagens de bioluminescência, as células transplantadas; avaliar os efeitos dos transplantes das CTDAh associadas ou não ao succinato sódico de metilprednisolona (após aplicação prévia de succinato sódico de metilprednisolona), em ratos submetidos à lesão medular; avaliar a micção e parte motora; avaliar histologicamente as bexigas urinárias e medulas espinhais.

1.1. REFERÊNCIAS

BERG, M. V. D. ; CASTELLOTE, J. M.; MAHILLO-FERNANDEZ, I.; DE PEDRO-CUESTA, J. Incidence of traumatic spinal cord injury in Aragón, Spain (1972- 2008). **Journal of Neurotrauma**. v. 28, n. 3, p. 469-77. 2011.

BOTELHO, R. V.; DANIEL, J. W.; BOULOSA, J. L. R.; COLLI, B. O.; FARIAS, R. L.; MORAES, O. J. S.; PIMENTA JR., W. E.; RIBEIRO, C. H.; RIBEIRO, F. R. B.; TARICCO, M. A.; CARVALHO, M. V.; BERNARDO, W. M. Efetividade da metilprednisolona na fase aguda do trauma raquimedular - revisão sistemática dos ensaios clínicos randomizados. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 55, n. 6, p. 729-737. 2009.

CAMPOS, M. F; RIBEIRO, A. T; LISTIK, S.; PEREIRA, C. A. B; SOBRINHO, J. A; RAPOPORT, A. Epidemiologia do traumatismo de coluna vertebral. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v. 35, n. 2, p. 88-93. 2008.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of Pathology**. v. 217, n. 2, p. 318-324. 2009.

CAPLAN A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 98, p. 1076-1084. 2006.

CARVALHO, K. A. T.; VIALLE, E. N.; MOREIRA, G. H. G.; FRANCISCO, J. C.; SIMEONI, R. B.; OLIVEIRA, L.; CUNHA, R. C.; GUARITA-SOUZA, L. C.; OLANDOSKI, M.; VIALLE, L. R. G. Avaliação funcional da terapia autóloga de células derivadas medula óssea, fração mononuclear no trauma crônico da medula espinal – modelo experimental em animais. **Jornal Brasileiro de Transplantes**. v. 10, p. 664-668. 2007.

CRIGLER, L.; KAZHANIE, A.; YOON, T.J.; ZAKHARI, J.; ANDERS, J.; TAYLOR, B.; VIRADOR, V. M. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. **The FASEB Journal – The Journal of the American Societies for Experimental Biology**. v. 21, n. 9, p. 2050-2063. 2007.

CUNNINGHAM, M. G.; DONALDS, R. A.; SCOUTEN, C. W.; TRESCH, M. C. A versatile, low-cost adaptor for stereotaxic and electrophysiologic spinal preparations in juvenile and adult rodents. **Brain Research Bulletin**. v. 68, n. 3, p. 157-162. 2005.

CUSTÓDIO, N. R. de O.; CARNEIRO, M. R.; FERES, C. C.; LIMA, G. H. S.; JUBÉ, M. R. R.; WATANABE, L. E.; SALIBA, L. G. R. S. O.; DAHLER, S.; GARCIA, A. C. F. Lesão Medular no Centro de Reabilitação e Readaptação Dr. Henrique Santillo (CRER-GO). **Coluna/Columna**. v. 8, n. 3, p. 265-268. 2009.

DE UGARTE, D. A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO Z.; ZUK, P. A.; ZHU, M.; DRAGOO, J. L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M. H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**. v. 174, n. 3, p. 101-109. 2003.

DEFINO, H. L. A. Trauma raquimedular. **Medicina**. v. 32, n. 4, p. 388-400. 1999.

FALCONER, J. C.; NARAYANA, P. A.; BHATTACHARJEE, M.; LIU, S. J. Characterization of an experimental spinal cord injury model using waveform and morphometric analysis. **Spine**. v. 21, n. 1, p. 104-112. 1996.

FAULKNER, G.; GORCZYNSKI, P.; ARBOUR, K.; LETTS, L.; WOLFE, D. L.; MARTIN, G. K. A. Messenger and Methods of Disseminating Health Information Among Individuals with Spinal Cord Injury: A Scoping Review. In: BERKOVSKY, T. C. **Handbook Spinal Cord Injuries: Types, Treatments and Prognosis**. New York: Nova Science Publishers, 2010. Cap. 8, p. 349-374.

FITZMAURICE, S. N. **Neurologia em Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 181-183.

HO, C. H.; WUERMSER, L. A.; PRIEBE, M. M.; CHIODO, A. E.; SCELZA, W. M.; KIRSHBLUM, S. C. Spinal cord injury medicine. Epidemiology and classification.

Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. v. 88, n. 3, Suppl 1, p. S49-54. 2007.

KIM, H.; WALCZAK, P.; MUJA, N.; CAMPANELLI, J. T.; BULTE, J. W. M. ICV-Transplanted human glial precursor cells are short-lived yet exert immunomodulatory effects in mice with EAE. **Glia.** v. 60, n. 7, p. 117-1129. 2012.

KOLOSSOV, E.; LU, Z.; DROBINSKAYA, I.; GASSANOV, N.; DUAN, Y.; SAUER, H.; MANZKE, O.; BLOCH, W.; BOHLEN, H.; HESCHELER, J.; FLEISCHMANN, B. K. Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. **The FASEB Journal – The Journal of the American Societies for Experimental Biology.** v. 19, n. 6, p. 577-579. 2005.

KORBLING M, ESTROV Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **The New England Journal of Medicine.** v. 349, n. 6, p. 570-582. 2003.

LAI, Y.; DROBINSKAYA, I.; KOLOSSOV, E.; CHEN, C.; LINN, T. Genetic modification of cells for transplantation. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 60, n. 2, p. 146-159. 2008.

LUO, J.; HO, P.; STEINMAN, L.; WYSS-CORAY, t. Bioluminescence in vivo imaging of autoimmune encephalomyelitis predicts disease. **Journal of Neuroinflammation** v. 5, n.6, p. 1-6. 2008.

McDONALD, J. W.; BECKER, D.; SADOWSKY, C. L.. Restoring function after spinal cord injury. **The Neurologist.** v. 9, p. 1-15. 2003.

MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science.** v.119, p. 2204-2213. 2006.

MEYER, F.; VIALLE, L. R.; VIALLE, E. N.; BLEGGI-TORRES, L. F.; RASERA, E.; LEONEL, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v. 18, n. 3, p. 203-208. 2003.

MINGUELL, J. J.; CONGET, P. ERICES, A. Biology and Clinical Utilization of Mesenchymal Progenitor Cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 33, n. 8, p. 881-887. 2000.

MUSINA, R. A.; BEKCHANOVA, E. S.; SUKHIKH, G. T. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** v. 139, n. 4, p. 504-509. 2005.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY DATABASE. Disponível em: <http://www.spinalcord.uab.edu>. Acessado em 09 de março de 2013.

NETTO, C. C.; GAIA, L. F. P.; SATTIN, A. A.; CRISTANTE, A F.; MARCON, R. M.; BARROS FILHO, T. E. P.; OLIVEIRA, R. P.; ROCHA, I. D.; DIAS, A. R.; OMORI, C. H. Efeitos do tempo de descompressão após trauma medular na recuperação

neurológica em ratos wistar. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 18, n. 6, p. 315-320. 2010.

NOBLE, L. J.; WRATHALL, J. R. Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. **Experimental Neurology**. v. 88, n. 1, p. 135-149. 1985.

NÖTH, U.; OSYCZKA, A. M.; TULI, R.; HICKOK, N. J.; DANIELSON, K. G.; TUAN, R. S. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 20, n. 5, p. 1060-1069. 2002.

PAL, R.; GOPINATH, C.; RAO, N.; BANERJEE, P.; KRISHNAMOORTHY, V.; VENKATARAMANA, N. K.; TOTEY, S. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. **Cytotherapy**. v. 12, n. 6, p. 792-806. 2010

PARK, W. B.; KIM, S. Y.; LEE, S. H.; KIM, H.; PARK, J.; HYUN, J. K. The effect of mesenchymal stem cell transplantation on the recovery of bladder and hindlimb function after spinal cord contusion in rats. **BioMed Central Neuroscience**. v. 11, p. 119-130. 2010.

PAULA, S; PEDROSO, M. F.; DALBEM, A.; COSTA, Z. S. M.; VITOLA, A.; BAES, C. V. W.; SILVA, J. L. B.; FRIEDRICH, M. A. G.; COSTA, J. C. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 263-269. 2005.

PEREIRA L. V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 13, p. 7-14. 2008.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**. v. 95, n. 1, p. 9-20. 2004.

POYNTON, A. R.; O'FARRELL D. A.; SHANNON, F.; MURRAY, P.; McMANUS, F.; WALSH, M. G. An evaluation of the factors affecting neurological recovery following spinal cord injury. **Injury**. v. 28, n. 8, p. 545-58. 1997.

RABEH, S. A.N.; CALIRI, M. H. L. Capacidade funcional em indivíduos com lesão de medula espinhal. **Acta Paulista de Enfermagem**. v. 23, n. 3, p. 321-7. 2010.

REBELATTO, C.K.; AGUIAR, A. M.; MORETÃO, M. P.; SENEGAGLIA, A.C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V. F.; BROFMAN, P. S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L. S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**. v. 233, n. 7, p. 901-913. 2008.

RODRIGUES, N. R.; LETAIF, O. B.; CRISTANTE, A. F.; MARCON, R. M.; OLIVEIRA, R. P.; BARROS FILHO, T. E. P. Padronização da lesão de medula espinhal em ratos wistar. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 18, n. 4, p. 182-186. 2010.

ROET, K. C. D.; EGGERS, R.; VERHAAGEN, J. Noninvasive bioluminescence imaging of olfactory ensheathing glia and schwann cells following transplantation into the lesioned rat spinal cord. **Cell Transplantation**. v. 21, p. 1853-1865. 2012.

SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M.; VILLEROCHÉ, V. J.; ROSSI, G. A.; BROUTY-BOYÉ D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**. v. 85, n. 8, p. 962-971. 2005.

SAKANAKA, M.; ZHU, P.; ZHANG, B.; WEN, T.; CAO, F.; MA, Y.; SAMUKAWA, K.; MITSUDA, N.; TANAKA, J.; KURAMOTO, M.; UNO, H.; HATA, R. Intravenous Infusion of Dihydroergocristine Rb1 Prevents compressive Spinal Cord Injury and Ischemic Brain Damage through Upregulation of VEGF and Bcl-x. **Journal of Neurotrauma**. v. 24, n. 6, p. 1037-1054. 2006.

SCHWAB, J. M., K. BRECHTEL, C. A. MUELLER, V. FAILLI, H. P. KAPS, S. K. TULI E H. J. SCHLUESENER. Experimental strategies to promote spinal cord regeneration - an integrative perspective. **Progress in Neurobiology**. v. 78, n. 2, p. 91-116. 2006.

SHARP, N. J. H; WHEELER, S. J. **Small animal spinal disorders: Diagnosis and Surgery**. 2ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005, p. 81-91.

SHI, S.; BARTOLD, P. M.; MIURA, M.; SEO, B. M.; ROBEY, P. G.; GRONTHOS, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthodontics & Craniofacial Research**. v. 8, n. 3, p. 191-199. 2005.

SOBANI, Z. A.; QUADRI, S. A.; ENAM, A. Stem cells for spinal cord regeneration: current status. **Surgical Neurology International**. v. 1, p. 93-107. 2010.

TOOMBS, J. P.; WATERS, D. J. Afecção do Disco Intervertebral. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007. v.1, cap.80, p.1193 - 1209.

VASCONCELOS, E. C. L. M.; RIBERTO, M. Caracterização clínica e das situações de fratura da coluna vertebral no Município de Ribeirão Preto, propostas para um programa de prevenção do trauma raquimedular. **Coluna/Columna**. v. 10, n. 1, p. 40-43. 2011.

VIALLE, E. N.; VIALLE L. R. G.; RASERA, E.; CECHINEL, C.; SEYBOTH, C.; LEONEL, I. Controle da cistite hemorrágica em ratos submetidos à lesão medular experimental padronizada. **Arquivos de Medicina**. v. 2, p. 165-18. 2001.

VIALLE, E.; VIALLE, L. R. G.; RAZERA, E.; CECHINEL, C.; LEONEL, I.; SEYBOTH, C. Avaliação da recuperação motora em ratos submetidos à lesão medular experimental. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 37, n. 3, p. 83-88. 2002.

VIALLE, E. N.; VIALLE, L. R. G.; BLEGGI-TORRES, L. F., SAKAMOTO, K. S. Avaliação histológica do efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular

experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 42, n. 4, p. 101-113. 2007.

WYNDAELE, M.; WYNDAELE, J. J. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? **Spinal cord**. v. 44, n. 9, p. 523-529. 2006.

2 PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MEDULAR

RESUMO

A lesão medular é incapacitante, irreversível e de custo econômico e social elevado. Neste estudo objetivou-se padronizar um modelo de lesão medular, que produza paraplegia, com o uso de cateter e avaliar histologicamente a efetividade da lesão. Foram realizadas as lesões medulares em ratos Wistar de 20 semanas de idade e peso variando de 250-270g, utilizando-se o cateter Fogarty nº 3 e compressão na região toracolombar (T8) durante 5 minutos. Foram estudados três grupos: grupo A, animais controles sem lesão medular; grupos B e C com lesão medular induzida por preenchimento do balão do cateter com 50 μ L e 80 μ L respectivamente. Foi realizada avaliação motora pela aplicação da escala BBB, antes da compressão, após recuperação anestésica, 24, 72 e sete dias após a compressão. Após o sétimo dia da lesão, os animais foram submetidos à eutanásia, foi feita a retirada da medula espinhal, fígado e rins e realizada a análise histológica com a coloração hematoxilina-eosina. A mortalidade variou entre os grupos, 0% no grupo A, 38,5% no B e 48% no C. Nestes dois últimos grupos a causa da morte foi edema pulmonar neurogênico, confirmado clínica e histologicamente. As medulas espinhais histologicamente apresentaram diferentes graus de edema, congestão vascular e hemorragia, enquanto que os fígados e os rins apresentaram diferentes graus de congestão vascular e necrose. Em relação à recuperação dos movimentos, no grupo A verificou-se 100% de escore 21, no B 25% de escore 21, 37,5% de escore 11 e 37,5% de escore 0, enquanto no grupo C verificou-se 100% de escore 0. Conclui-se que o procedimento realizado utilizando-se 80 μ L de solução salina para preencher o balão do cateter, apesar de maior mortalidade, foi mais eficiente, pois apresentou um grupo homogêneo e com maior porcentagem de animais com lesão completa (paraplegia).

Palavras-chave: modelo de lesão medular, paraplegia, estudo histológico, edema pulmonar neurogênico.

2.1 STANDARDIZATION OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF SPINAL CORD INJURY

ABSTRACT

Spinal cord injury is disabling, irreversible and with high economic and social cost. This study aimed to standardize a model of spinal cord injury to induce paraplegia using a catheter and to evaluate the effectiveness of the histological lesion. Cord lesions were performed in Wistar rats 20 weeks old and 250-270g, using the Fogarty catheter n° 3 and compression in the thoracolumbar region (T8) for 5 minutes. We studied three groups: A control group without spinal cord injury, B and C groups subjected to spinal cord injury induced by fill the balloon catheter with 50 μ L and 80 μ L respectively. Motor evaluation was performed by applying the BBB scale, before compression, after recovery from anesthesia, 24 hours, 72 hours and 7 days after compression. At the seventh day after injury, the animals were euthanized. The spinal cord, liver and kidneys were removed and a histological analysis was performed with hematoxylin-eosin staining. Mortality varied among groups, it was 0% in group A, 38,5% in group B and 48% in group C. In the latter two groups the cause of death was neurogenic pulmonary edema, clinically and histologically confirmed. Histologically the spinal cord showed different degrees of edema, hemorrhage and vascular congestion, while the liver and kidneys showed different degrees of vascular congestion and necrosis. Regarding movement recovery, in group A it was found a 100% score 21, in group B 25% of score 21, 37,5% score 11 and 37,5% of score zero, whereas in group C there was a 100% of score zero. It is concluded that the procedure performed using 80 μ L of saline to inflate the balloon catheter, although the higher percentage of mortality, was more efficient because it induced a homogeneous group and with a higher percentage of animals with complete injury (paraplegia).

Keywords: spinal cord injury model, paraplegia, histology, neurogenic pulmonary edema.

2.2 INTRODUÇÃO

A lesão medular pode resultar em incapacidade sensitiva e motora permanente e seu tratamento ainda permanece um desafio tanto para a medicina humana como veterinária (ARIAS et al., 2007), pois além dos neurônios não regenerarem (JEFFERY et al., 2001), não há consenso sobre o tratamento ideal (OLBY e JEFFERY, 2007), e de acordo com Fitzmaurice (2011), não existe cura farmacológica para danos à medula espinhal.

Os estudos que envolvem modelos experimentais de lesão medular são fundamentais para a compreensão dos mecanismos primários e secundários de lesão tecidual decorrentes do trauma raquimedular. Dados de estudos experimentais mostraram que distúrbios ocorridos em cobaias podem ser extrapolados a seres humanos se as suas devidas proporções anatômicas, fisiológicas e metabólicas forem respeitadas (MEYER et al., 2003; RODRIGUES et al., 2010).

Há um século, Allen (1911) foi o primeiro a padronizar lesão experimental pela técnica de queda de esfera metálica com peso preestabelecido sobre a medula espinhal de cães. Tarlov et al. (1953), introduziram a técnica de compressão medular em cães por implantação de um balão inflável no espaço extradural. O desenvolvimento de balões infláveis menores tornou possível estudar tais modelos em animais de laboratório (RIVILIN e TATOR, 1978). Guner e Young em 1992 desenvolveram o *Impactor* NYU, respeitando os preceitos de Allen (MEYER et al., 2003), porém as variações nos resultados devido a melhora motora espontânea parcial (SOUZA et al., 2009) ou total (ŠEDÝ et al., 2009), após alguns dias de lesão medular justificam mais estudos.

Os objetivos deste estudo foram padronizar um modelo de lesão medular com cateter extradural que produza paraplegia e avaliar histologicamente a efetividade da lesão para estudos com terapia celular e suas possíveis implicações.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Foram utilizados 41 ratos Wistar fêmeas adultos jovens, com média de 20 semanas de idade e peso variando de 250 a 270 g.

Os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Protocolo nº 601 - Anexo A) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (Parecer nº - 67978 – Anexo B).

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com 2 ou 3 animais em cada uma delas com água e ração *ad libitum*. O biotério dispôs de controle de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($45\% \pm 15\%$), ventilação (exaustores superiores e inferiores) e de ciclos luminosos de 12/12h (lâmpada fluorescente).

2.3.2 Indução do trauma medular

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (70mg/Kg), cloridrato de xilazina (10mg/kg) ambos por via intramuscular e sulfato de atropina (0,05mg/kg) pela via intraperitoneal. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano em circuito anestésico com oxigênio 100%. Para minimizar o edema

pulmonar neurogênico decorrente da lesão, foram feitas duas aplicações de furosemida (4mg/kg) pela via subcutânea, sendo uma pré-operatória e outra no período pós-operatório imediato.

Após a tricotomia e antissepsia foi realizada incisão de pele de 5,0 cm na linha média dorsal, tendo como referência os processos espinhosos da oitava vértebra torácica (T8) a primeira vértebra lombar (L1). O tecido subcutâneo foi incisado, seguido do afastamento subperiosteal da musculatura paravertebral, com uso de lâmina de bisturi nº 11.

A décima vértebra torácica (T10) foi identificada por contagem dos arcos costais, nela foi realizada laminectomia, e em seguida foi inserido e conduzido cranialmente o balão do cateter Fogarty nº3 no espaço epidural até o segmento medular T8.

A compressão medular foi por preenchimento do balão durante 5 minutos. Antes e logo após a compressão medular a integridade do cateter foi testada fora do animal e em caso de ruptura do balão, nova compressão de 5 minutos era realizada.

A aproximação da musculatura foi realizada com fio poliglactina 910 4-0, em padrão de sutura ancorada de Ford, posteriormente foi realizada a dermorrafia com mononáilon 3-0, seguindo o mesmo padrão de sutura. Ao término do procedimento cirúrgico e por mais três dias foi administrada enrofloxacina (10 mg/Kg) por via intramuscular a cada 24 horas.

Após a recuperação anestésica foi realizada analgesia com morfina (5mg/Kg) por via subcutânea a cada 6 horas, por 3 dias. Diariamente, em intervalos de 6 horas, foram realizados esvaziamentos manuais da bexiga urinária.

2.3.3 Grupos

Os animais foram identificados e divididos aleatoriamente em três grupos: grupo A (controle) - três ratas submetidas à laminectomia em T10, e introdução do balão do cateter no canal vertebral até o nível de T8, sem ser preenchido; grupo B: 13 ratas submetidas à trauma medular com 50 μ L de volume de solução salina utilizada para preencher o balão e grupo C: 25 ratas submetidas à trauma medular com volume de preenchimento de 80 μ L.

2.3.4 Avaliação motora pós-lesão

Os animais foram observados antes da compressão, após recuperação anestésica, 24 horas, 72 horas e 7 dias após a compressão, em uma caixa plástica sem barreiras para a avaliação da atividade motora voluntária dos membros pélvicos, seguindo escala de BBB (BASSO et al., 1995). A escala varia entre 0 e 21 pontos e reflete as condições locomotoras do animal, em que escore 0 representa paralisia total do membro e o escore 21 atividade locomotora normal.

2.3.5 Eutanásia e necropsia dos animais

No 7º dia pós-trauma, os animais foram submetidos à eutanásia sob analgesia preemptiva com citrato de fentanila (0,3mg/Kg) por via intramuscular e sedação com diazepam (2,5mg/Kg) por via intraperitoneal. Foram anestesiados com isoflurano em circuito anestésico com oxigênio 100%, após incisão de pele e ressecção do esterno, foi feita a canulação do ápice do ventrículo esquerdo com agulha fina e pequena incisão na aurícula direita.

Foi conectado o sistema de infusão à agulha e infundidos por bomba infusora 150 ml de solução salina isotônica seguida de 350 ml de paraformaldeído a 4%. Em seguida foi realizada necropsia e coleta de medula espinhal, pulmões, fígado e rins.

2.3.6 Análises histopatológicas de secções de medula espinhal, pulmões, fígado e rins

Os pulmões, fígados, rins e as regiões de medula espinhal que sofreram compressão dos animais dos grupos A, B e C, e dos que foram a óbito durante ou após compressão medular, foram fixados em formalina 10% (pH 7,0±0,2) para processamento histológico.

2.3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Todos os cálculos foram realizados utilizando o *software* estatístico Graphpad Prism version 5.00 for Windows, San Diego-Califórnia-EUA.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Avaliação motora pós-lesão

Na avaliação de recuperação dos movimentos verificou-se no grupo A 100% de escore 21; no grupo B 25% de escore 21, 37,5% de escore 11 e 37,5% de escore 0; no grupo C verificou-se 100% de escore 0 (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Resultados referentes aos escores obtidos pelos animais, na Escala BBB, nos diversos momentos avaliados neste estudo.

<u>Pontuação pela Escala BBB para os animais nos momentos avaliados</u>						
Grupo experimental						Valor de p*
	Pré-teste	Após recuperação anestésica	24h	72h	7 dias	
Grupo A (n=3)	21±0 a/a	21±0a/a	21±0a/a	21±0a/a	21±0a/a	1,00
Grupo B (n= 8)	21±0 a/a	9,35b/b	9,35b/b	9,35b/b	9,35b/b	0,0017
Grupo C (n= 13)	21±0 a/a	0±0c/a	0±0c/a	0±0c/a	0±0c/a	1,00
Valor de p (entre grupos)**	1,00	0,001	0,001	0,001	0,001	

Os valores estão expressos em média±erro padrão da média;

* Teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey;

** Teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey;

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos/momentos (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

2.4.2 Aspectos macroscópicos e microscópicos da zona de medula espinhal lesionada

Nos grupos B e C a compressão medular causou zona hemorrágica com achatamento de parênquima (Figura 2.1).



Figura 2.1 - Imagens macroscópicas das medulas espinhais de animais dos Grupos A (a), B (b) e C (c). Nota-se medula espinhal íntegra na imagem a, zonas hemorrágicas e de achatamento de parênquima medular (setas) nas imagens b e c.

Microscopicamente nestes animais, nas áreas da medula espinhal com compressão, verificou-se diminuição do número de neurônios, hemorragia, vacuolização e malacia do parênquima medular (Figuras 2.2, 2.3 e 2.4).

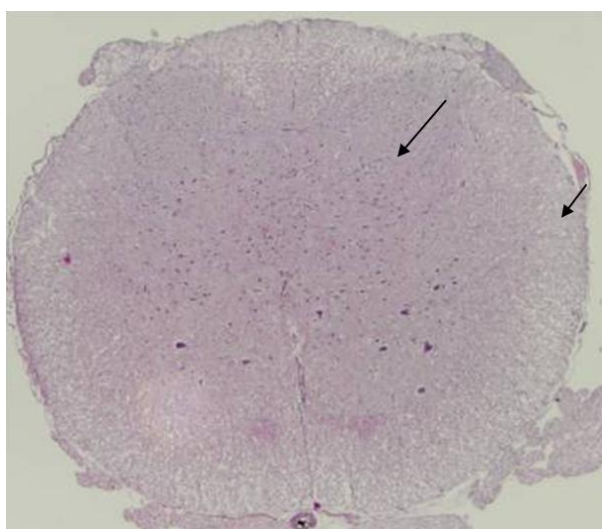


Figura 2.2 - Corte histológico do epicentro da compressão medular de animal do Grupo A. Nota-se a preservação das substâncias branca (seta menor) e cinzenta (seta maior).

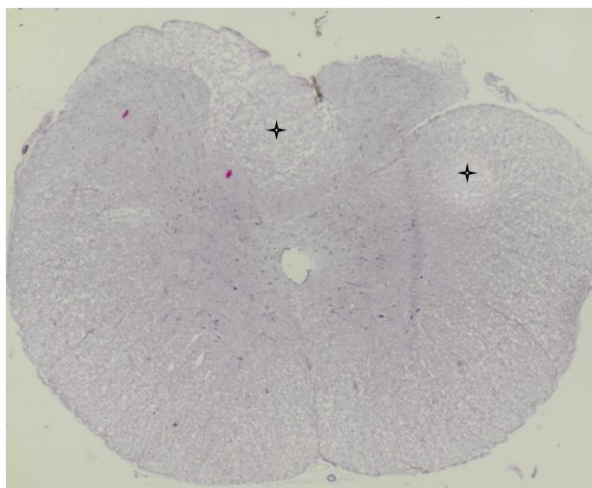


Figura 2.3 – Corte histológico do epicentro da compressão medular de animal do Grupo B. Nota-se áreas com necrose e vacuolização (asteriscos).

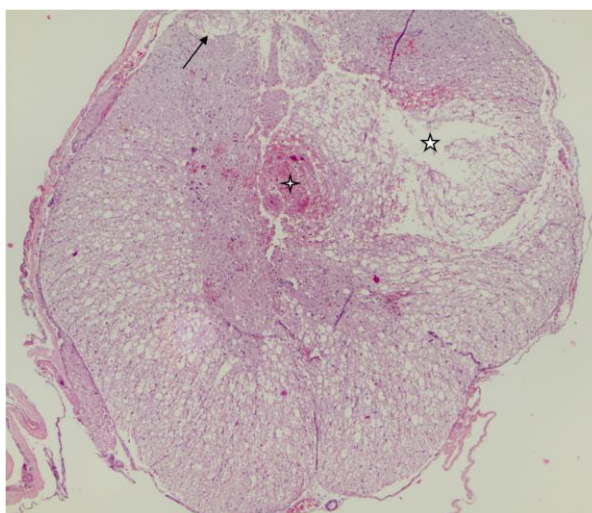


Figura 2.4 – Corte histológico do epicentro da compressão medular de animal do Grupo C. Nota-se hemorragia (asterisco), necrose e vacuolização (seta), diminuição de neurônios motores e ruptura do parênquima medular (estrela).

2.4.3 Mortalidade durante e após compressão medular

Não ocorreu mortalidade no grupo A, no grupo B foi de 38,45% (sendo 4 óbitos durante a compressão e 1 após 24h), no grupo C foi de 48% (sendo 9 casos durante a compressão, 1 após 24h e 2 após 48h).

Antes da parada cardíaca ocorreu taquicardia seguida de bradicardia, e bradipneia seguida de apneia. Epistaxe e hemoptise foram observadas em todos os animais que foram a óbito. Devido à manifestação clínica, aos resultados da

necropsia e análises histopatológicas, conclui-se que o óbito ocorreu por edema pulmonar neurogênico (Figura 2.5).

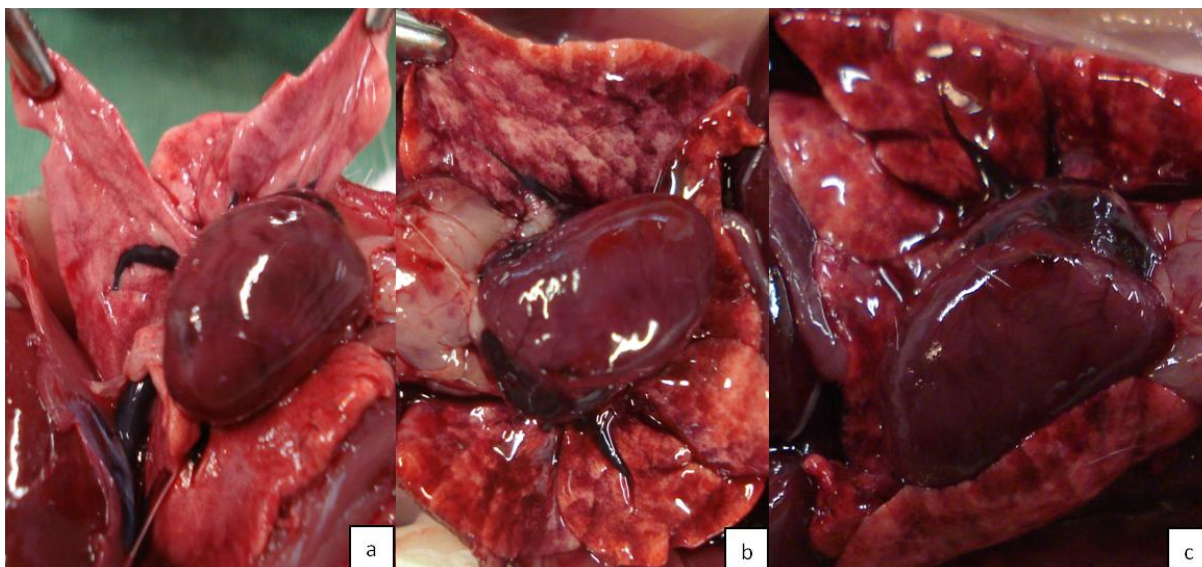


Figura 2.5 - Imagens macroscópicas dos pulmões e corações de ratos dos Grupos A (a), B (b) e C (c). Nota-se aspecto hemorrágico progressivo nos pulmões.

2.4.4 Análises histopatológicas dos pulmões, fígado e rins dos animais que foram a óbito durante ou após compressão medular.

Os exames histopatológicos dos pulmões revelaram edema pulmonar de grau leve a moderado, acentuada congestão vascular e moderada hemorragia, sem áreas de necrose (Figura 2.6).

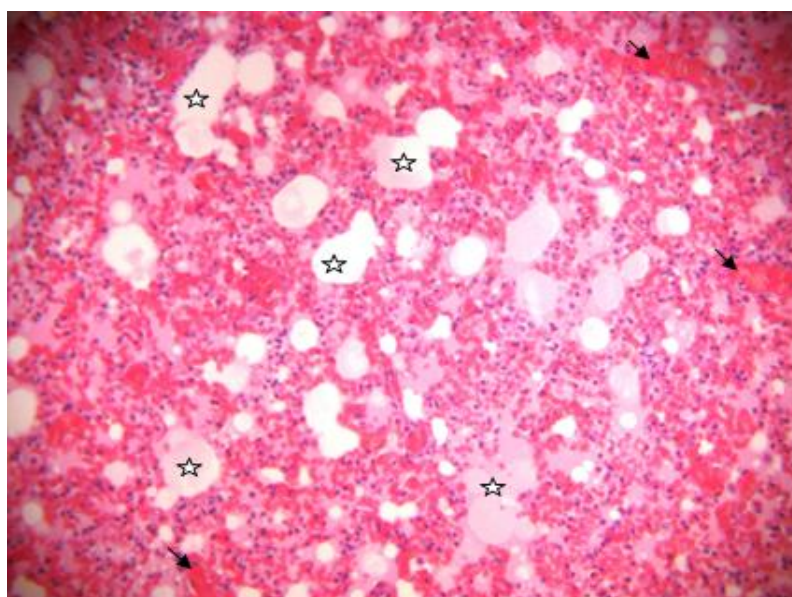


Figura 2.6 - Corte histológico de pulmão de rato Wistar do Grupo C após compressão de medula espinhal. Nota-se edema pulmonar neurogênico (estrelas) e hemorragia (setas pretas). Aumento de 100x.

No fígado observou-se congestão vascular de grau moderado a severo, necrose leve e ausência de edema e de hemorragia. Nos rins ocorreu congestão vascular e necrose moderada, sem edema e hemorragia.

2.5 DISCUSSÃO

Damy et al. (2010) com o objetivo de contribuir à pesquisa em cirurgia experimental, apresentaram uma análise dos principais parâmetros exigidos a serem observados pelos comitês internacionais e nacionais de ética e bem-estar animal, cujo cumprimento é pré-requisito para publicação em periódicos arbitrados de circulação internacional. Neste estudo os preceitos de padronização da genética, estado sanitário e do ambiente da espécie analisada, a observação de condições adequadas no transporte, aclimatação, enriquecimento do ambiente, treinamento de técnicos em experimentação animal, gestão de informação, biossegurança, dieta, anestesia, cuidados pós-operatórios, analgesia e eutanásia foram seguidos, estas etapas fundamentais visaram à obtenção de resultados com alto grau de acuidade, alto nível de reprodutibilidade e precisão.

A avaliação motora utilizada neste estudo mostrou que a laminectomia e introdução do cateter vazio no espaço epidural foi incapaz de causar déficit motor, pois todos os animais do Grupo A tiveram escore BBB de 21. Nos animais do grupo C o déficit motor ocorreu devido ao volume de compressão, uma vez que 100% tiveram escore BBB de 0. No grupo B foi observada grande variação de déficit motor, creditada à incapacidade da compressão de 50 μ L de solução salina utilizada para preencher o balão do cateter, causar paralisia total por lesão primária,

decorrente das forças que causam dano mecânico instantaneamente após o evento traumático. Šedý et al. (2009) observaram que na compressão de 15 μ L há déficit motor de escore 9-11 na escala BBB. Com 5 e 10 μ L estes autores observaram melhora espontânea progressiva e completa da motricidade, escore 21, tornando este volume não recomendável para produzir lesão medular.

No presente estudo não foram verificadas variações motoras e o quadro após recuperação anestésica foi mantido até o dia da eutanásia, resultados que diferem dos de Souza et al. (2009) que estudaram as consequências da lesão por contusão da medula espinhal, associada ao estreitamento do canal vertebral, no comportamento motor de ratos, avaliando-se o efeito do tempo para descompressão na recuperação neurológica dos animais. Excetuando o grupo controle, perceberam melhora parcial espontânea e progressiva em todos os grupos, as análises motoras por eles realizadas ocorreram 1, 3 e 7 dias após a compressão.

A lesão primária nos animais deste estudo foi induzida pela contusão da medula espinhal produzida pela ruptura do parênquima medular, lesão vascular e hemorragia, quadro observado em todas as análises histológicas dos animais do Grupo C. Essas lesões se propagam devido à ativação de eventos bioquímicos, levando a necrose e lesão excitotóxica (ARIAS et al., 2007; PARK et al., 2010). Leal Filho et al. (2005) observaram hemorragia e discreta descontinuidade unilateral de parênquima medular, após compressão de 20 μ L, durante um minuto, resultado que não foi correlacionado com a análise motora. Estes autores verificaram edema pulmonar e congestão renal e hepática, resultados também observados no presente estudo.

A mortalidade observada neste estudo, pelo preenchimento do balão e consequente compressão medular está associada à grande ativação simpática que

causou aumento de pressão arterial, ativação barorreflexa e redistribuição de sangue dos vasos esplâncnicos para o leito vascular pulmonar, desencadeando edema pulmonar neurogênico (ŠEDÝ et al. 2009); as porcentagens de mortalidade nos grupos B e C foram próximas; tais manifestações clínicas foram também observadas por Leal Filho et al. (2005) e Šedý et al. (2009), com cateter mais fino, menor preenchimento do balão e menor tempo de compressão.

As lesões medulares ainda são consideradas intratáveis e incuráveis (ARIAS et al., 2007), não há cura farmacológica (FITZMAURICE, 2011), e apesar das evidências científicas favoráveis ao uso de células-tronco em doenças neurológicas, consideráveis avanços necessitam ser feitos (PAULA et al., 2005; PEREIRA, 2008).

A validação de modelo experimental de lesão medular reprodutível, de fácil feitura e pouco dispendioso como realizado neste estudo, abre perspectivas para a realização de mais estudos que envolvam lesão medular e terapia celular.

2.6 CONCLUSÃO

O modelo de lesão medular com compressão de 80 μ L para preencher o balão do cateter Fogarty é válido, pois resultou em paraplegia em todos os animais e não houve melhora espontânea e progressiva, apesar de acarretar índice médio de mortalidade.

2.7 REFERÊNCIAS

- ALLEN, A. R. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. Preliminary report. **The Journal of the American Medical Association**. v. 57, p.878-880. 1911.
- ARIAS, M. V. B.; SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 28, n. 1, p. 115-134. 2007.
- BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **Journal of Neurotrauma**. v. 12, n. 1, p. 1-21. 1995.
- DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 56, n. 1, p. 103-111. 2010.
- FITZMAURICE, S. N. Fratura da Coluna Vertebral. In: **Neurologia em Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, Cap. 42. p. 181-183.
- JEFFERY, N.; PENDERIS, J.; SMITH, P. M.; FRANKLIN, R. J. Bridging the divide: spinal cord repair by cellular transplantation-from research laboratory to therapeutic application. **Journal of Small Animal Practice**. v.42, p.428-432. 2001.
- LEAL FILHO, M. B.; MORANDIN, R. C.; ALMEIDA, A. R., CAMBIUCCI, E. C.; METZE, K.; BORGES, G.; GONTIJO, J. A. R. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury - An experimental model. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. n.63, v.4, p.990-996. 2005.
- MEYER, F.; VIALLE, L. R.; VIALLE, E. N.; BLEGGI-TORRES, L. F.; RASERA, E.; LEONEL, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, n. 3, p. 203-208. 2003.
- OLBY, N.; JEFERRY, N. Patogenia das doenças do sistema nervoso central. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007. Cap.77, p.1132-1147.
- PARK, W. B.; KIM, S. Y.; LEE, S. H.; KIM, H.; PARK, J.; HYUN, J. K. The effect of mesenchymal stem cell transplantation on the recovery of bladder and hindlimb function after spinal cord contusion in rats. **BioMed Central Neuroscience**. v. 11, p. 119-130. 2010.
- PAULA, S; PEDROSO, M. F.; DALBEM, A.; COSTA, Z. S. M.; VITOLA, A.; BAES, C. V. W.; SILVA, J. L. B.; FRIEDRICH, M. A. G.; COSTA, J. C. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 263-269. 2005.

PEREIRA L. V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 13, p. 7-14. 2008.

RIVLIN, A. S.; TATOR, C. H. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. **Surgical Neurology**. v. 10, n.1, p.38-43. 1978.

RODRIGUES, N. R.; LETAIF, O. B.; CRISTANTE, A. F.; MARCON, R. M.; OLIVEIRA, R. P.; BARROS FILHO, T. E. P. Padronização da lesão de medula espinal em ratos wistar. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 18, n. 4, p. 182-186. 2010.

ŠEDÝ, J.; ZICHA, J.; KUNEŠ, J.; JENDELOVÁ, P.; SYKOVÁ, E. Rapid but not Slow Spinal Cord Compression Elicits Neurogenic Pulmonary Edema in the Rat. **Physiological Research**. v.58, p. 269-277. 2009.

SOUZA, A. S.; ESCOBAR, F. B.; DEL BEL, E. A. Influência do estreitamento do canal vertebral e do tempo para a descompressão na recuperação locomotora de ratos. **Coluna/Columna**. v. 8, n.2, p.117-126. 2009.

TARLOV, I. M; KLINGER, H.; VITALE, S. Spinal cord compression studies: I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. **AMA Archives of Neurology & Psychiatry** v.70, p. 813-818. 1953.

3 RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DA MICÇÃO E DA MOTRICIDADE APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HETERÓLOGAS EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO MEDULAR COMPRESSIVA, SUBMETIDOS OU NÃO AO TRATAMENTO COM CORTICOIDE

RESUMO

As lesões medulares são frequentes em pessoas e em animais, sem cura farmacológica para a lesão primária e a corticoterapia é alternativa para contenção dos danos secundários. A interrupção da fase inflamatória e a terapia celular como tratamento conjuntos são possibilidades de aperfeiçoar o reparo da lesão, antes das degenerações parenquimatosa e neuronal. O transplante de células-tronco derivadas do tecido adiposo no local da lesão, devido ao seu potencial imunossupressor e atuação no reparo tecidual pode ser terapia alternativa. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos das células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (CTDAh) associadas ou não a corticoterapia em ratos Wistar com lesão medular compressiva. Metodologia: as CTDAh foram cultivadas entre a terceira e quinta passagens. Parte das células foram transduzidas utilizando vetores lentivirais da luciferase, para o rastreamento *in vivo* das células transplantadas. A lesão medular nos ratos foi realizada após laminectomia em T10 e introdução do cateter Fogarty nº 3 no espaço epidural, o *cuff* localizado em T8 foi preenchido com 80 µL de solução salina por 5 minutos. Os animais foram aleatoriamente separados em três grupos experimentais com 21 animais em cada grupo. Grupo controle (A): animais que receberam aplicações de meio de cultura (50 µL); grupo células-tronco (B): receberam duas aplicações de CTDAh ($1,2 \times 10^6$ células) sete e 14 dias pós-lesão; grupo células-tronco associadas a corticoide (C): animais tratados com 30mg/kg de succinato sódico de metilprednisolona (SSMP) três horas após a lesão e duas aplicações de CTDAh ($1,2 \times 10^6$ células) sete e 14 dias pós-lesão. As infusões de células ou meio de cultura foram realizadas no espaço epidural. A localização e sobrevivência das CTDAh foram avaliadas por imagens de bioluminescência *in vivo* em animais dos grupos B e C. O esvaziamento vesical dos ratos foi efetuado diariamente, em média a cada seis horas, durante três meses. As avaliações motoras iniciaram 24h após a lesão medular, sendo repetidas diariamente até três meses pós-lesão, utilizando a escala de Basso-Beattie-Bresneham (BBB). Após este período os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica, em seguida foram realizadas coletas de bexiga urinária e medula espinhal para análises histopatológicas. Resultados: as análises de bioluminescência revelaram a presença das CTDAh no local da lesão. Em relação à incontinência urinária e a motricidade, todos os animais do grupo A mantiveram o estado de incontinência urinária e paraplegia, enquanto que no Grupo B 66,6% (n=14) dos animais recuperaram a continência urinária e 23,8% (n=5) recuperaram parcialmente a motricidade, no Grupo C 61,9% (n=13) dos animais recuperaram a continência urinária e 19% (n=4)

recuperaram parcialmente a motricidade. Os grupos B e C apresentaram diferença estatística na continência urinária e motricidade quando comparados ao grupo A. A recuperação da continência urinária nos grupos B e C ocorreram, em média, nove dias após o segundo transplante. O início da recuperação parcial da motricidade no Grupo B ocorreu, em média, após 11 dias do segundo transplante, o melhor escore (mediana de 5,5) deste grupo ocorreu, em média, após 21 dias do segundo transplante. No grupo C o início da recuperação parcial da motricidade ocorreu, em média, nove dias após o segundo transplante, o melhor escore (mediana de 5,0) ocorreu, em média, após 17 dias do segundo transplante. Verificou-se aparência histológica normal nas amostras de bexiga urinária dos grupos A, B e C. O grau de colagenização na parede vesical foi diferente entre os grupos, na região do colo vesical (região A) não ocorreu diferença significativa entre os grupos A e B, mas ocorreu diferença significativa quando o Grupo C foi comparado aos grupos A e B. Na região do corpo da bexiga (região B) não ocorreu diferença significativa entre os grupos A e B, e B e C, mas ocorreu diferença significativa entre os Grupos A e C. Em relação à espessura da parede vesical, não houve diferença significativa entre os grupos A, B e C. As análises histológicas medulares revelaram menor percentual de tecido lesado e maior concentração de neurópilos nas medulas espinhais dos animais dos grupos B e C. Em relação às áreas medulares, não houve diferença significativa entre os grupos A, B e C. Conclusão: o uso de CTDAh associado ou não ao SSMP contribuiu positivamente para a melhora miccional e motora de ratos wistar submetidos à lesão medular compressiva. O esvaziamento por compressão manual impediu alterações histológicas na bexiga urinária. A corticoterapia associada ao transplante de células, não demonstrou ser um tratamento mais eficiente comparativamente ao transplante isolado de CTDAh.

Palavras chave: trauma medular, corticoterapia, células-tronco derivadas do tecido adiposo, terapia celular, bioluminescência, recuperação miccional, recuperação motora, rato Wistar.

3.1 FUNCTIONAL RECOVERY OF MOTOR FUNCTION AND URINATION AFTER TRANSPLANTATION OF HETEROLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS IN RATS SUBJECTED TO SPINAL CORD COMPRESSION, TREATED OR NOT TREATED WITH CORTICOSTEROIDS

ABSTRACT

The spinal cord lesions are common in people and animals, there is no pharmacological cure for the primary lesion and corticosteroid therapy is the alternative for to contain secondary lesion. The interruption of the inflammatory phase and cell therapy as treatment sets are possibilities to improve the repair of the lesion before parenchymal and neuronal degeneration. The transplantation of stem cells derived from adipose tissue at the lesion site, because of its potential immunosuppression and role in tissue repair can be an alternative therapy. The present study aimed to evaluate the effects of stem cells derived from human adipose tissue (CTDAh) associate or not with corticosteroid therapy in Wistar rats with spinal cord compression. Methodology: the CTDAh were grown between the third and fifth passages. Part of the cells were transduced using lentiviral vectors luciferase for in vivo tracking of transplanted cells. Spinal cord injury in rats after laminectomy was performed at T10, and introduction of a Fogarty catheter n° 3 in the epidural space, located on the cuff in T8 was filled with 80 µL of saline for 5 minutes. The animals were randomly separated into three groups with 21 animals in each group. Control group (A): animals that received applications of culture medium (50 µL); stem cell group (B) received two applications CTDAh ($1,2 \times 10^6$ cells) seven and 14 days post-injury; stem cell group associated with corticosteroids (C): animals treated with 30mg/kg of methylprednisolone sodium succinate (SSMP) three hours after the injury, and two applications of CTDAh ($1,2 \times 10^6$ cells) seven and 14 days post-injury. The applications of cells or culture medium were performed in the epidural space. The location and survival of CTDAh were assessed by in vivo bioluminescence images of animals in groups B and C. The voiding of the mice was performed daily on average every six hours for three months. Performance tests began 24 hours after spinal cord injuries, repeated daily until three months post-injury, using the scale of Basso-Beattie-Bresneham (BBB). After this period the animals were euthanized by anesthetic overdose then samples were taken from the urinary bladder and spinal cord for histopathological analysis. Results: The analysis of bioluminescence revealed the presence CTDAh at the lesion site. Regarding urinary incontinence and motility, all animals in group A remained the state of urinary incontinence and paraplegia, while in Group B 66.6% (n = 14) of the animals regained urinary continence and 23.8% (n = 5) partially recovered motor function, in Group C 61.9% (n = 13) of the animals recovered urinary incontinence and 19% (n =

4) partially recovered motor function. Groups B and C showed no statistical difference in urinary continence and motor function when compared to group A. The recovery of urinary continence in groups B and C were, on average nine days after the second transplantation. The start of partial recovery of motor function in Group B took place on average after 11 days from the transplantation, the better score (median 5,5) of this group was on average 21 days after the second transplantation. In group C the beginning of the partial recovery of motor function occurred on average nine days after the transplantation, the best score (median 5,0) occurred on average at 17 days after the second transplantation. It was found in normal histological appearance of urinary bladder samples from groups A, B and C. The degree of collagen in the bladder wall was different between groups in the region of the bladder neck (region A) no significant difference between groups A and B, but significant difference when group C was compared to groups A and B. In the region of the body from the bladder (region B) there was no significant difference between groups A and B, and B and C, but significant difference between Groups A and C. Regarding the thickness of the bladder wall, there was no significant difference between groups A, B and C. Histological analysis revealed a lower percentage of spinal cord injured tissue and greater concentration neuropils in the spinal cords of animals in groups B and C. Regarding medullary areas, there was no significant difference between groups A, B and C. Conclusion: The use of CTDAh with or without the SSMP contributed positively to the improved voiding and motor of Wistar rats submitted to spinal cord compression. Emptying by manual compression prevented histological changes in the urinary bladder. Corticosteroid therapy associated with the transplantation of cells, not shown to be a more efficient compared to the transplantation of isolated CTDAh.

Keywords: spinal trauma, steroid therapy, stem cells derived from adipose tissue, cellular therapy, bioluminescence, recovery voiding, motor recovery, Wistar rat.

3.2 INTRODUÇÃO

A principal causa de consulta neurológica em animais de companhia é o traumatismo medular (TOOMBS e WATERS, 2007; GREEN e BOSCO, 2008; OSAKO et al., 2008), cuja gravidade depende da velocidade, do grau e da duração da lesão compressiva (BRAUND e VITE, 2004; SOUZA et al., 2009).

Existem diferenças na patogenia entre lesões súbitas e afecções compressivas de lenta progressão, que se traduzem em alterações de natureza distinta no parênquima medular, implicando diferentes estratégias terapêuticas (PELLEGRINO, 2003; PARK et al., 2012).

A extensão do dano mecânico primário varia amplamente em significado, ocorrendo desde a ruptura completa da medula espinhal em fraturas vertebrais deslocadas até a lesão mínima em certas herniações discais (TOOMBS e WATERS, 2007). Os déficits neurológicos em consequência da lesão aguda da medula espinhal podem resultar de secção mecânica (lesão primária) das vias neuronais imediatamente após o trauma, assim como de lesão tecidual tardia (secundária) que ocorre em um período de minutos a dias após a primária. Essas lesões tardias relacionam-se ao desencadeamento de uma cascata de eventos destrutivos sistêmicos, locais, celulares, que promovem isquemia, hipóxia, edema e diversos eventos bioquímicos prejudiciais à medula espinhal (OSAKO et al., 2008).

O traumatismo na medula espinhal causa perdas motoras e sensitivas, alterações no funcionamento do sistema urinário, além de comprometimento intestinal, respiratório, circulatório, sexual e reprodutivo (LIANZA et al., 2001; PARK et al., 2012). As lesões medulares em nível torácico e lombar resultam em disfunções do trato urinário inferior, como a hiperatividade da bexiga urinária, dissinergia vesico-esfincteriana e retenção urinária (FORNER, 2011).

Corticoides são amplamente utilizados em todos os tipos de lesões medulares, principalmente porque são eficazes na redução da inflamação e no alívio da dor. No entanto, existe uma má interpretação generalizada de que estes efeitos benéficos são igualmente aplicáveis para a lesão neural. Embora os corticoides possam reduzir a inflamação associada com, por exemplo, a extrusão discal, podem também prejudicar a sobrevivência de todos os neurônios lesionados por interferir no metabolismo da glicose. Isto pode ter pouca consequência em lesões medulares brandas, mas pode ser crítico em lesões graves. Nesses casos, o animal pode ter menor dor, mas pode ter menor chance de recuperação neurológica (SHARP e WHEELER, 2005). De acordo com Park et al. (2012), terapia específica para minimizar os danos secundários da lesão medular em Medicina Veterinária continua a ser controversa, especialmente no que diz respeito à utilização de succinato sódico de metilprednisolona (SSMP).

Diversas pesquisas têm explorado o potencial da terapia celular, utilizando o transplante de vários tipos de células, como as células de Schwann (BIERNASKIE et al., 2007; SABERI et al., 2008), células-tronco neurais (SCHULTZ, 2005; TARASENKO et al., 2007; PARR et al., 2008), células-tronco mesenquimais (CHOPP et al., 2000; OSAKA et al., 2010), fibroblastos (TOBIAS et al., 2003; WONG et al., 2008) e células olfativas (PEARSE et al., 2007; GUEST et al., 2008).

Estudos com terapia celular utilizando células-tronco têm sido realizados para o tratamento da lesão medular (OGAWA et al., 2009; SAHNI e KESSLER, 2010; TSUJI et al., 2011).

A célula-tronco tem capacidade de autorrenovação ilimitada/prolongada, produz pelo menos um tipo de célula altamente diferenciada, ou seja, a que tem a capacidade de se dividir em células idênticas a ela ou em diferentes tipos de células

(PEREIRA, 2008). O estudo das técnicas de transplante de células-tronco, o desenvolvimento e ampliação do seu uso, principalmente das células adultas, mostrou que elas possuem capacidade de diferenciação em diversos tecidos após o implante *in vivo*, demonstrando sua multipotencialidade (KRAUSE et al., 2001; WEBB et al., 2010).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células-tronco adultas, e foram descritas como células precursoras dos fibroblastos da medula óssea (FRIEDENSTEIN et al., 1970). A caracterização destas células engloba um conjunto de características morfológicas, fenotípicas e funcionais (DOMINICI et al., 2006). Elas devem ser aderentes, apresentar morfologia alongada semelhantes aos fibroblastos e expressar os marcadores CD105, CD73 e CD90 com ausência de expressão de CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR. Funcionalmente devem ter o potencial de diferenciação em pelo menos três linhagens celulares: adipócitos, condrócitos e osteoblastos (DOMINICI et al., 2006).

As principais funções das CTM são a manutenção e renovação de tecidos mesenquimais adultos (CAPLAN, 2009). Além da capacidade de diferenciação, estas células apresentam efeitos parácrinos via secreção de fatores de crescimento, citocinas, mediadores anti-fibróticos ou angiogênicos (DJOUAD et al., 2009).

As CTM apresentam baixa imunogenicidade e podem ser utilizadas de forma alogênica sem problemas com a rejeição (MINGUELL et al., 2000; DAI et al., 2005; FRASER et al., 2006; JIANG et al., 2006; GHANNAM, et al., 2010).

Estudos das CTM de forma xenogênica foram realizados em cães por Plotnikov et al. (2007), ratos nudes por Guest et al. (2008), ratos Wistar por Pal et al. (2010) e Park et al. (2010), ratos Balb/c por Ra et al. (2011), entre outros, e estes

autores não encontraram efeitos colaterais após aplicação e nenhuma evidência de tumorigenicidade.

As CTM podem ter efeito anti-inflamatório no local da lesão, pois reprimem a vigilância imunológica e inibem a destruição mediada pelas células T e B no sítio danificado (KOLOSSOV et al., 2005). A imunossupressão mediada pelas CTM é devido à liberação de fatores solúveis e ao contato célula-célula, essencial para a sua função inibidora (SELMANI et al., 2008).

As CTM têm potencial de diferenciação em diferentes linhagens como óssea, cartilaginosa, adiposa, muscular, hepática, endotelial, epitelial e neurogênica (FERRARI et al., 1998; MEZEY et al., 2000; DENIS e CAPLAN, 2004; BARREIRA, 2005; KUMAR et al., 2005; KOERNER et al., 2006; MCINTOSH et al., 2006; MEIRELES et al., 2006; MIAO et al., 2006; BROOKE et al., 2007; HU et al., 2007; NIE et al., 2007; NIXON et al., 2008; DAI et al., 2009). Esta capacidade de diferenciação torna as CTM excelentes candidatas para utilização na terapia celular.

Estudos mostram que as CTM podem ser obtidas de diferentes fontes (NOTH et al., 2002; SABATINI et al., 2005; SHI et al., 2005; CRIGLER L et al., 2007). A mais comum é a medula óssea, porém Zuk et al. (2002), Pittenger e Martin (2004) observaram células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTDA). As vantagens das CTDA são: alta frequência no tecido (0,5%), fácil obtenção (DE UGARTE et al., 2003; MUSINA et al., 2005) e potencial de proliferação superior ao das células-tronco derivadas da medula óssea (LEE et al., 2004; KIM et al., 2007). Assim, as CTDA também podem ser utilizadas na medicina regenerativa (PUISSANT et al., 2005; BAI et al., 2007; HERRERO et al., 2012).

As CTM são facilmente isoladas, cultivadas e multiplicadas *in vitro*, porém suas características ainda não estão totalmente definidas. De todas as formas de

células-tronco adultas estudadas até o presente, são as que podem ser derivadas de várias localidades e ao mesmo tempo, têm a mais ampla capacidade de diferenciação e grande plasticidade (ZAGO e COVAS, 2004; NARDI e MEIRELES, 2006; BROOKE et al., 2007; SHI et al., 2010; GEBLER et al., 2012), desta forma podem ser utilizadas na terapia celular.

Existem evidências científicas favoráveis ao uso de células-tronco em doenças neurológicas (PAULA et al., 2005; PEREIRA, 2008). O uso de células-tronco humanas em ratos com lesão medular revelou migração de células para o local lesionado (PAL et al., 2010) e redução da reação inflamatória (PARK et al., 2010).

As células transplantadas podem ser rastreadas após sua transdução com vetores específicos. A utilização da imagem de bioluminescência *in vivo* facilita a análise das células transplantadas e possibilita a avaliação da efetividade dos tratamentos (LUO et al., 2008; KIM et al., 2012; ROET et al., 2012). A avaliação da bioluminescência não invasiva foi utilizada em vários estudos na investigação da sobrevivência de células-tronco transplantadas em ratos com lesão raquimedular (OKADA et al., 2005; TAKAHASHI et al., 2011).

O estudo da corticoterapia associada à terapia celular no trauma medular reveste-se de grande importância por se tratar de lesão ainda considerada como intratável e incurável. Devido ao ceticismo e controvérsias sobre o uso de corticoides e de células-tronco no trauma medular em diferentes espécies, inclusive no homem, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos das células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (CTDAh) em ratos Wistar com lesão medular compressiva e a interferência da corticoterapia. Os objetivos específicos foram: avaliar a micção e

parte motora, avaliar por métodos histológicos as bexigas urinárias e medulas espinhais e monitorar *in vivo*, por bioluminescência, as células transplantadas.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Animais

Os experimentos foram realizados seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Protocolo nº 601 - Anexo A) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (Parecer nº - 67978 – Anexo B).

Foram utilizados 63 ratos Wistar fêmeas adultos jovens, com média de 20 semanas de idade e peso variando de 250 a 270 g.

Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com dois ou três animais em cada gaiola, com água e ração *ad libitum* em biotério com controle de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($45\% \pm 15\%$), ventilação (exaustores superiores e inferiores) e de ciclos luminosos de 12/12h (lâmpada fluorescente).

Os animais foram identificados e aleatorizados em três grupos: Grupo A: 21 ratos submetidos à trauma medular e a duas aplicações de placebo, uma aos sete e outra aos 14 dias pós-trauma (grupo controle negativo); Grupo B: 21 animais submetidos à trauma medular e a dois transplantes de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (CTDAh) nos mesmos períodos pós-trauma. Grupo C: 21 animais submetidos à trauma medular e uma aplicação de succinato sódico de

metilprednisolona (SSMP) após três horas por via intraperitoneal (IP) e a dois transplantes de CTDAh nos mesmos períodos pós-trauma.

3.3.2 Isolamento, cultivo e caracterização das CTDAh

O tecido adiposo foi obtido de 5 doadores que foram submetidos à operação bariátrica e dermolipectomia. Cerca de 100 mL de tecido adiposo (TA) foram processados. Todas as amostras foram coletadas após o preenchimento do termo de consentimento, que foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná protocolo nº 04257912.6.0000.0020 (Anexo B).

As CTDAh foram isoladas utilizando o método de digestão enzimática, conforme Strutt et al. (1996). Brevemente, 100 mL de tecido adiposo foram lavados com solução salina fosfatada (PBS - Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e a digestão foi feita com 1 mg/mL de collagenase tipo I (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) durante 30 minutos a 37°C sob constante agitação, seguido por filtração utilizando filtros de 100 e 40 µm (BD FALCON™, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA). A suspensão celular foi centrifugada a 800 g por 10 minutos e os eritrócitos contaminantes foram removidos após a lise com um tampão pH 7,3.

As células foram lavadas e cultivadas numa densidade de 1×10^5 células/cm² em frascos de cultura de T75 (TPP, Trasadingen, Switzerland) em meio DMEM-F12 (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) (100 µg/mL). O meio foi trocado dois dias após o plaqueamento inicial. O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana. Após cinco a sete dias, quando as culturas alcançaram cerca de 80%-90% de confluência,

as células foram dissociadas utilizando 0,25% de tripsina/EDTA (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e replaqueadas (passagem 1) para propagação. As células foram expandidas para obter-se o número necessário para os transplantes.

A caracterização destas células quanto à morfologia, imunofenotipagem por citometria de fluxo e diferenciação celular em adipócitos, osteoblastos e condrócitos foi realizado conforme Rebelatto et al. (2008). As células transplantadas foram utilizadas entre terceira e quinta passagem.

3.3.3 Viabilidade das CTDAh

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante vital Azul de Tripan (Sigma Aldrich, USA), que cora as células mortas em azul. Para esta avaliação foi adicionado 10 µL de Azul de Tripan e 50 µL de CTDAh ($1,2 \times 10^6$). Em seguida foi feita homogeneização e colocado 10 µL na câmara de Neubauer. A contagem do número de células, foi realizada no quadrante central, contando-se 5 subquadrantes: o subquadrante central e os quatro subquadrantes das extremidades. As células mortas incorporam o Azul de Tripan ficando com a cor azulada. Cálculo para o número final de células/mL: nº de células x 5 x 10 x dil x 1000 células/mL.

3.3.4 Transdução das CTDAh

Para o monitoramento *in vivo* da bioluminescência após o transplante das CTDAh, células HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) foram transfectadas com os vetores pMD2.G, pCMV_dr8.91 e pMSCV_Luc2_T2A utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen 11668-027) e foram mantidas durante três dias em cultura. O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado, filtrado com filtro de 0,22 µm, e ultracentrifugado por 28000 rpm por 1 hora e 30 minutos. Os *pellets*

foram ressuspensos em PBS/BSA 1%, distribuídos em alíquotas de 40µL e estocados a -80°C. As CTDAh foram transduzidas com o sobrenadante contendo as partículas virais e 10µg/µl de Brometo de Hexadimetrina (Polibreno, Sigma H9268). O meio utilizado para a transdução das células foi trocado a cada 24 horas durante três dias. Após este período, foi adicionado às culturas a puromicina (Sigma – P9620), para seleção das células, em uma concentração final de 10 mM. A expressão da luciferase foi observada utilizando o sistema de imagem IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA).

3.3.5 Imagem por bioluminescência - Imagem *in vitro*

Para determinar a bioluminescência nas culturas *in vitro*, as células transduzidas foram plaqueadas em placas de 24 poços em uma concentração de 30.000 células/poço com meio de cultura, na presença da D-Luciferina (150 µg/mL). A intensidade de luz das imagens foi obtida utilizando o sistema de imagem IVIS LUMINA II em um campo de captura de 12,7 x 12,7 cm. A bioluminescência foi medida na placa em uma série consecutiva de imagens de 30 segundos de exposição até a obtenção da maior intensidade de sinal (mensuração em *counts*). Para a análise foi determinada a região de interesse (ROI), correspondente à área total de um poço, e a quantificação da bioluminescência foi em fótons/segundo.

3.3.6 Indução do trauma medular

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (70mg/Kg/IM), cloridrato de xilazina (10mg/kg/IM) e sulfato de atropina (0,05mg/kg/IP). A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano em circuito anestésico com oxigênio 100%. Para minimizar o edema pulmonar neurogênico decorrente da lesão,

foram feitas duas aplicações de furosemida (4mg/kg), sendo uma pré-operatória e outra logo após a indução da lesão.

Os animais foram mantidos em decúbito ventral, após a tricotomia e antissepsia foi realizada incisão de pele de 5,0 cm na linha média dorsal, tendo como referência os processos espinhosos da oitava vértebra torácica (T8) à primeira vértebra lombar (L1). O tecido subcutâneo foi incisado, seguido do afastamento subperiosteal da musculatura paravertebral, com uso de lâmina de bisturi n.º 11.

A décima vértebra torácica (T10) foi identificada por contagem dos arcos costais, nela foi realizada laminectomia, e em seguida foi inserido e conduzido cranialmente o balão do cateter Fogarty n.º 3 no espaço epidural até o segmento medular T8.

A compressão medular foi por preenchimento do balão com 80 µL de volume de solução salina durante 5 minutos (Figura 3.1).

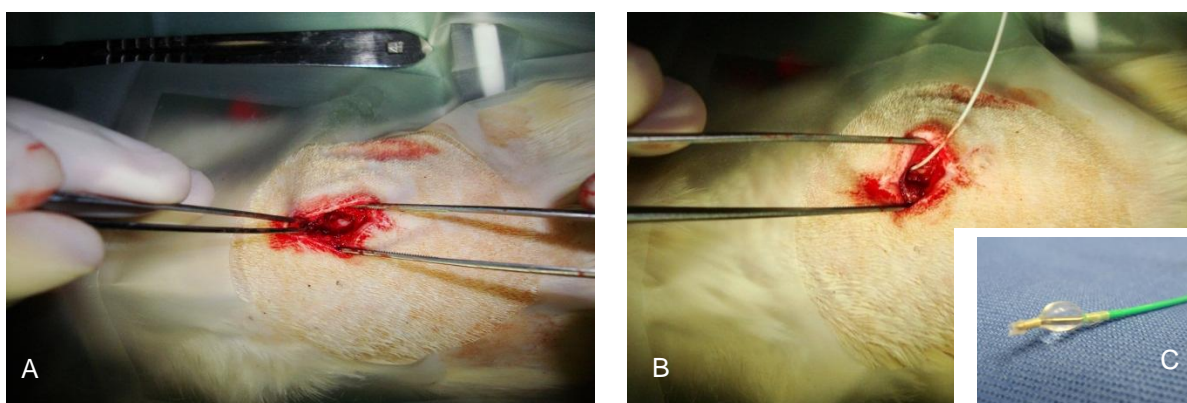


Figura 3.1- Indução do trauma medular. Laminectomia em rato *Wistar* e exposição da duramáter (A). Posicionamento do cateter Fogarty n.º 3 (B). Cateter Fogarty preenchido com 80 µL de volume de solução salina (C).

A integridade do balão do cateter foi testada fora do animal, antes e imediatamente após a compressão medular. Em caso de ruptura do balão, o cateter era substituído, sendo realizada nova compressão medular durante cinco minutos.

A aproximação da musculatura foi realizada com fio poliglactina 910 4-0, em padrão de sutura ancorada de Ford, posteriormente foi realizada a dermorrafia com mononáilon 3-0, seguindo o mesmo padrão de sutura.

3.3.7 Cuidados pós-lesão medular

Ao término do procedimento cirúrgico e por mais três dias foi administrada enrofloxacina a cada 24 horas (10mg/Kg) por via intramuscular. Após a recuperação anestésica e por mais três dias foi realizada analgesia com sulfato de morfina a cada 6 horas (5mg/Kg) por via subcutânea. Diariamente, durante 90 dias, em média a cada seis horas, foram realizados esvaziamentos manuais da bexiga urinária dos animais pertencentes aos Grupos A, B e C.

3.3.8 Avaliação do padrão miccional

Durante o esvaziamento das bexigas urinárias foi avaliada a presença de hematúria, incontinência por retenção com hiperfluxo ou incontinência por flacidez de esfíncteres vesicais.

3.3.9 Avaliação motora dos membros pélvicos

Os animais foram avaliados em campo aberto 24 horas após a lesão medular. A perda total de motricidade em membros pélvicos foi critério de inclusão. Diariamente, durante 90 dias, foram realizadas avaliações motoras. A escala adotada foi a de BBB (BASSO et al., 1995). Esta escala é dividida em pontuações de zero a 21, sendo zero igual à paraplegia e 21 igual a consistente coordenação na caminhada; paralelismo entre os membros durante apoio e elevação dos dedos;

estabilidade consistente do tronco e cauda levemente elevada durante locomoção (Anexo C).

As avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador, não cego, em campo aberto. Os somatórios das pontuações dos ratos de cada grupo foram comparados e avaliados estatisticamente.

3.3.10 Transplante das CTDAh no espaço epidural

Os transplantes foram realizados no sétimo e décimo quarto dias após a lesão medular. No transplante foram utilizadas $1,2 \times 10^6$ CTADh da terceira passagem, diluídas em 50 μ l de meio de cultura. As células foram aplicadas no espaço epidural com agulha acoplada a seringa de Hamilton. A agulha foi inserida no espaço epidural e mantida firmemente (Figura 3.2).



Figura 3.2- Transplante de CTDAh no espaço epidural de rato Wistar com lesão medular.

A cada minuto 10 μ l era aplicado e após a injeção dos 50 μ l, a agulha foi mantida no espaço epidural durante 5 minutos para impedir qualquer refluxo. Os animais do grupo controle receberam 50 μ l do meio de cultura.

Nove animais (14,3%) foram transplantados com células transduzidas e receberam por via intraperitoneal 150 mg/kg de luciferina (substrato da luciferase).

3.3.11 Imagem por bioluminescência - Imagem *in vivo*

Após os transplantes, a localização e sobrevivência das CTDAh foram avaliadas por imagens de bioluminescência *in vivo* em animais dos grupos B (n= 5) e C (n=4), animais do Grupo A não foram avaliados porque não receberam células, apenas meio de cultura.

A intensidade de luz foi detectada com o sistema de imagem *in vivo* (IVIS[®] LUMINA II; Xenogen, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) o qual consiste em uma câmara escura onde o animal é posicionado e recebe oxigênio e anestésico inalatório. A imagem é capturada por uma câmera de alta sensibilidade (CCD) (Figuras 3.3 e 3.4).

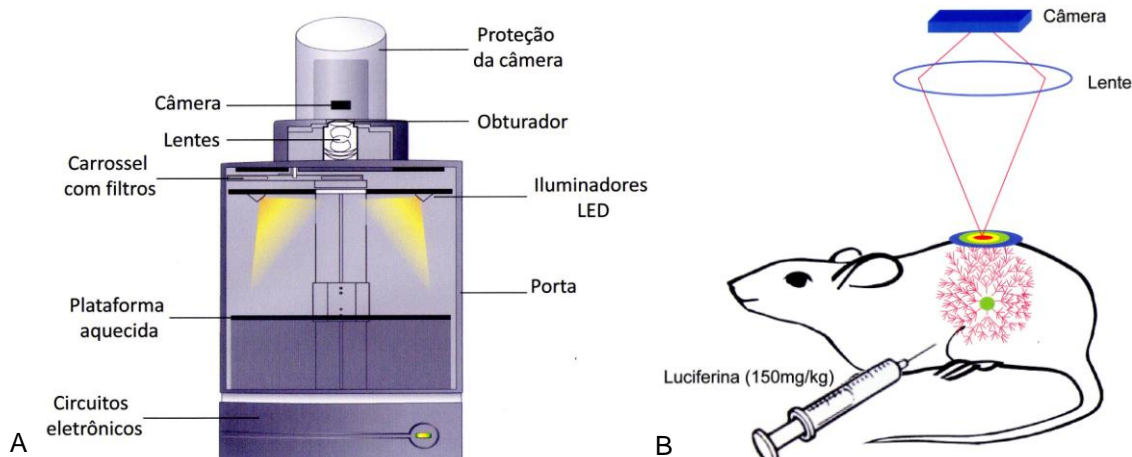


Figura 3.3- Estrutura do IVIS[®] Lumina II System (A). Processamento de imagem baseado em Bioluminescência (B).



Figura 3.4- Rato Wistar com lesão medular mantido sob anestesia após transplante de CTDAh com células marcadas (A). Equipamento IVIS Lumina, utilizado para avaliação pós-transplante das CTDAh *in vivo* por meio de bioluminescência.

A D-luciferina (150 mg/kg) foi aplicada via intraperitoneal nos ratos 5 minutos antes da obtenção da imagem. Os ratos foram anestesiados com isoflurano durante a aquisição da imagem (Figura 3.5), e foram posicionados na câmera em decúbito ventral e utilizado um campo de captura de 12,7 x 12,7cm. Uma série de imagens foi adquirida até a obtenção da maior intensidade de sinal (mensuração em *counts*). O sinal foi quantificado como fótons/segundo usando o *software LIVINGIMAGE* (versão 4.5) (Xenogen). A quantificação da intensidade de bioluminescência das células foi avaliada em fótons/segundo, os fótons foram obtidos de uma região de interesse, a qual foi mantida constante em área e posicionamento em todos os experimentos. A intensidade do sinal das células transplantadas foi medida no sétimo e décimo quarto dias pós-lesão.



Figura 3.5- Imagem representativa da injeção de luciferina por via intraperitoneal em rato Wistar com lesão medular após transplante das CTDAh transduzidas.

3.3.12 Eutanásia dos animais

No 90º dia pós-lesão medular, todos os animais pertencentes aos Grupos A, B e C foram submetidos à eutanásia. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (70 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) por via intramuscular e mantidos com isofluorano em circuito anestésico com oxigênio 100%, após incisão de pele e ressecção do esterno, foi feita a canulação do ápice do ventrículo esquerdo com agulha fina e pequena incisão na aurícula direita e foram infundidos, por bomba infusora, 150 mL de solução salina isotônica seguida de 350 mL de paraformaldeído a 4% refrigerado.

3.3.13 Análise histológica da bexiga urinária e da medula espinhal

Após os animais serem submetidos à eutanásia, foram realizadas necropsias e coletas das bexigas urinárias e dos segmentos medulares lesionados. Estes

materiais biológicos foram acondicionados individualmente em recipientes contendo formol a 10%. Depois de retirados do formol e lavados com água corrente por 15 minutos, os espécimes foram cortados em dois níveis da bexiga urinária (colo e corpo vesicais) e no epicentro da lesão medular.

Em seguida foram desidratados com álcool, diafanizados em xilol, submetidos à inclusão com formação dos blocos de parafina e seccionados com micrótomo a uma espessura média de 4 μ m.

Foram realizadas duas lâminas histológicas de cada bexiga urinária. A primeira foi corada com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação global dos cortes de tecido, enquanto a segunda pelo tricrômico de Masson (TM) para avaliação das fibras colágenas existentes. Para avaliação histológica da medula espinhal foi utilizada a coloração de HE. A análise dos cortes histológicos foi realizada sem o conhecimento prévio do patologista.

Com o uso do *software* DP2-BSW OLYMPUS, as imagens das lâminas histológicas foram digitalizadas. O *software* IMAGE PRO-PLUS foi utilizado para aferir oito espessuras de paredes das bexigas (Figura 3.6), sendo quatro da região do colo vesical (região A) e quatro da região do corpo (região B).

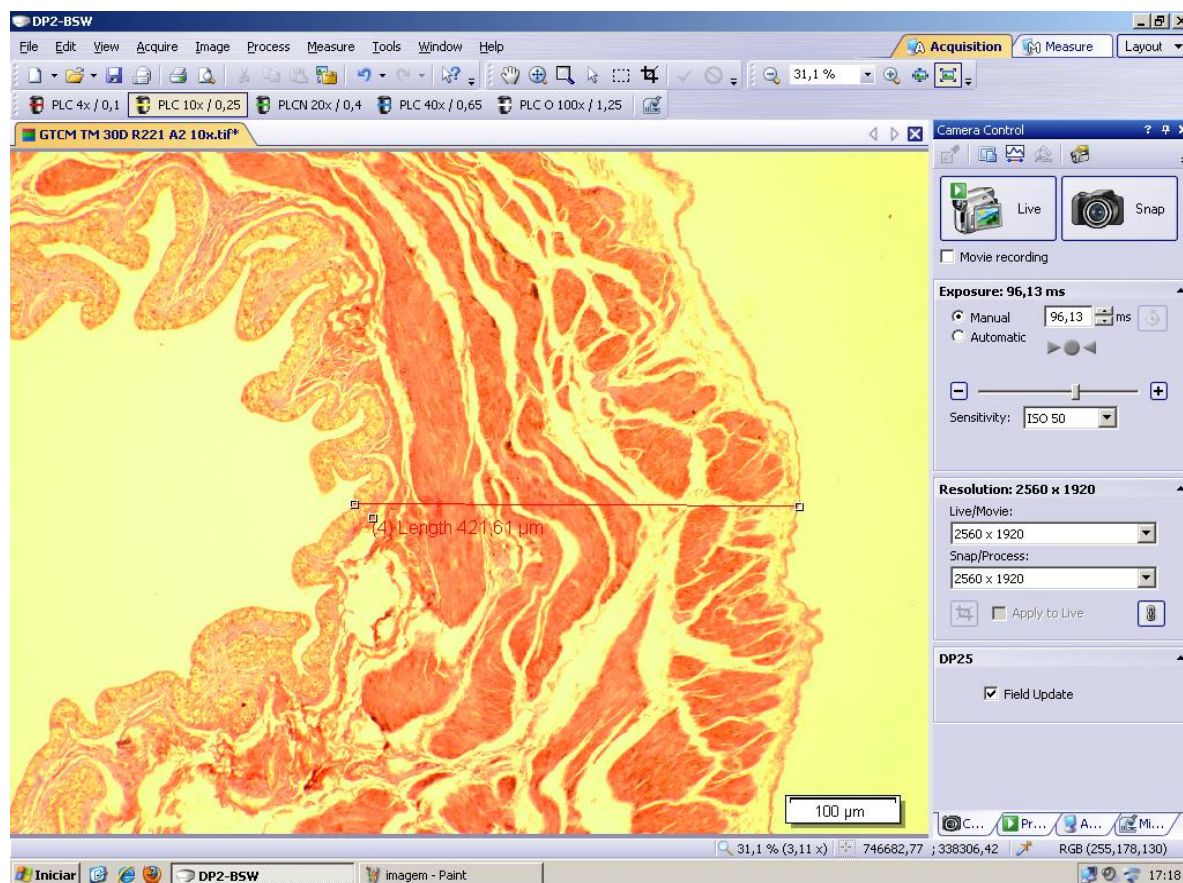


Figura 3.6– Imagem da espessura da região A (colo vesical) da parede vesical de rato submetido à trauma medular. Espessura aferida com o uso do *Software IMAGE PRO-PLUS*.

O mesmo *software* foi utilizado em cada imagem histológica de medula espinhal para aferição da área medular (Figura 3.7)

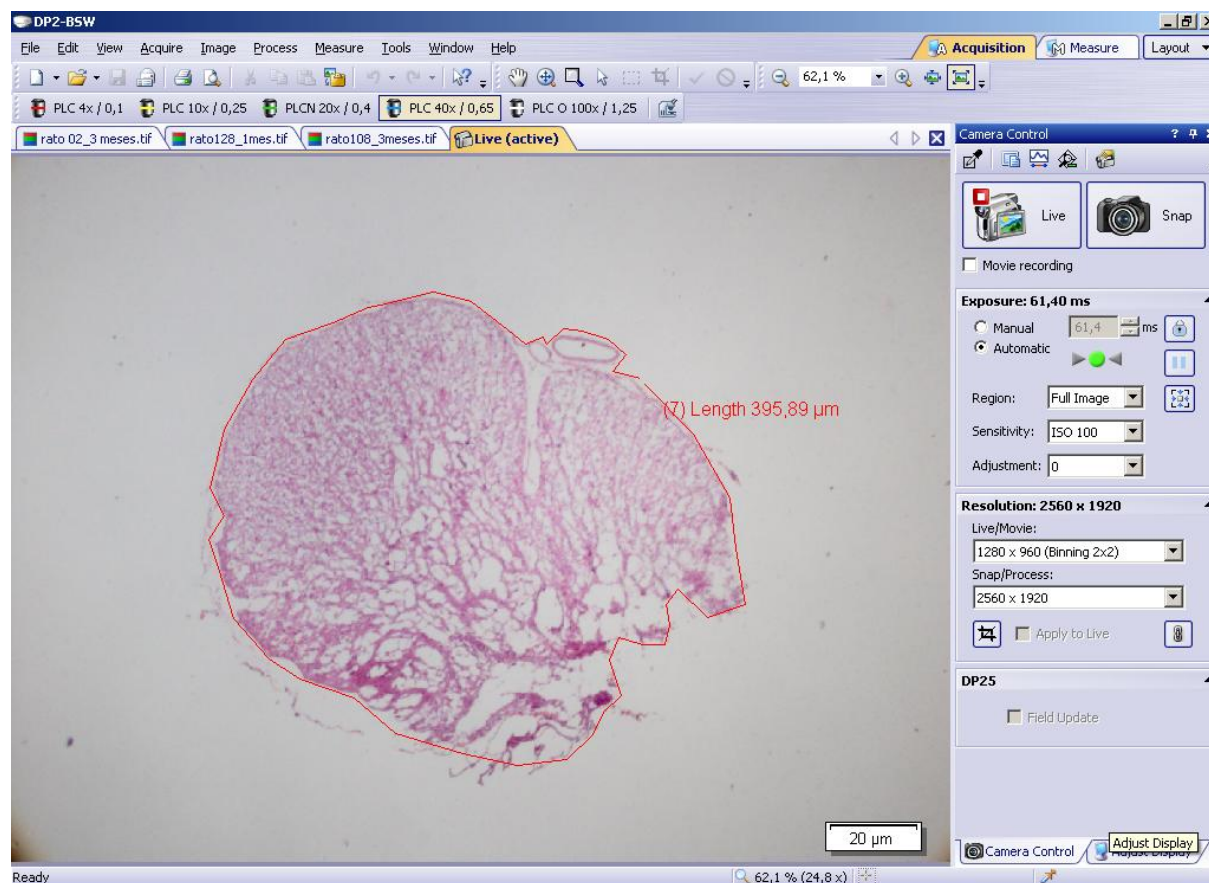


Figura 3.7- Imagem da área de medula espinal de rato submetido à trauma medular. Área aferida com o uso do *Software IMAGE PRO-PLUS*.

Realizou-se a avaliação qualitativa das bexigas utilizando como critérios a inflamação e a hemorragia na coloração HE, e deposição de colágeno na coloração TM. Os parâmetros utilizados para inflamação e hemorragia foram presente e ausente. Para a deposição de colágeno classificou-se como ausente, quando não haviam fibras depositadas; leve quando a deposição de fibras colágenas era em pequena quantidade, caracterizada por fibras depositadas em meio aos fibroblastos proliferados; moderada quando a deposição formava feixes de fibras espessas, intercaladas com áreas de tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados; e intensa, quando havia grande deposição de fibras colágenas, constituindo feixes de fibras espessas, compactamente arranjadas em meio a fibroblastos proliferados e sem áreas de tecido conjuntivo frouxo (GARROS et al., 2006; MAIA et al., 2006).

3.3.14 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados de motricidade e colagenização entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com posterior teste de Dunn's. Para a análise estatística dos dados de bioluminescência entre e dentro dos grupos foi utilizado o teste t. Os dados foram demonstrados em medianas. Na análise dos dados de avaliação da motricidade e incontinência foi utilizado o teste do Qui-quadrado. Para análise dos dados de espessura da bexiga foi utilizado ANOVA (one-way) seguido de teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi 5% ($\alpha=0,05$). Todos os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* version 5.00 for Windows, San Diego – Califórnia, EUA.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Viabilidade das CTDAh

A viabilidade média das células utilizadas no primeiro transplante (sete dias após a lesão medular) foi de 97,5% enquanto para o segundo transplante (quatorze dias após a lesão medular) foi de 98,7%.

3.4.2 Mortalidade durante e após lesão medular

Neste estudo evidenciou-se uma taxa de mortalidade de aproximadamente 38,2%, sendo as principais causas o edema pulmonar neurogênico, de 35,3% (n=36) (Figura 3.8) e a retenção urinária de 2,9% (n=3).

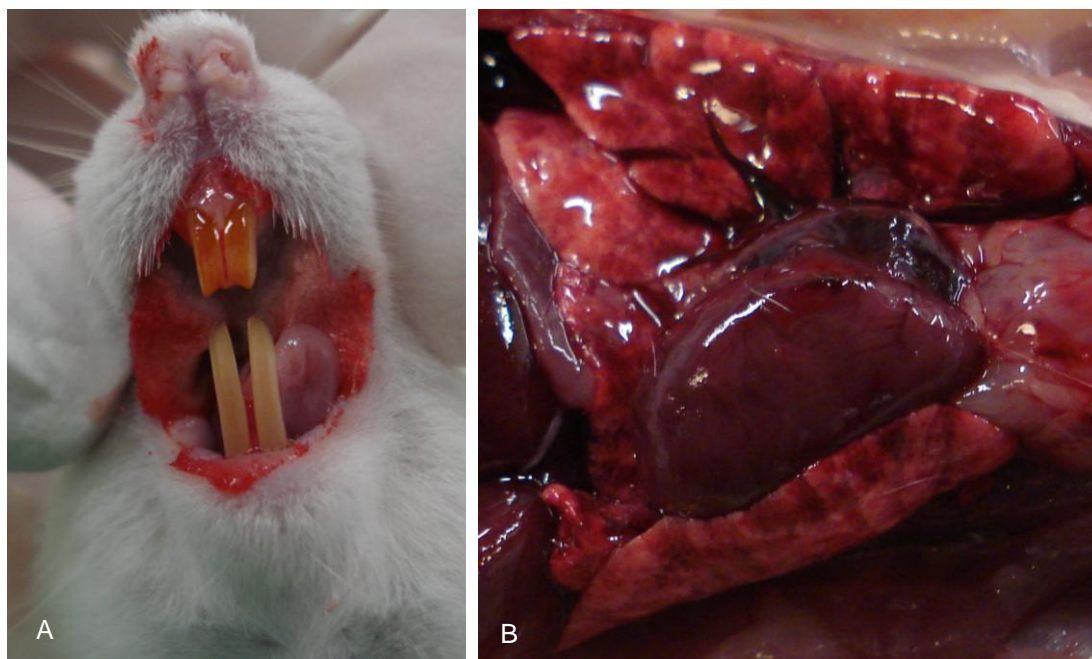


Figura 3.8- Imagem representativa de rato Wistar com epistaxe e hemoptise pós-lesão medular (A). Aspecto macroscópico do edema pulmonar neurogênico pós-lesão medular (B).

3.4.3 Avaliação do padrão miccional

Após a indução do trauma medular, 100% (n=63) dos animais manifestaram retenção urinária, sendo observada hematúria macroscópica em 87,3% (n=55). Durante quatro dias, em média, em 4,7% (n=3) ocorreu retenção urinária não responsiva à massagem vesical e após tentativa de esvaziamento vesical por cistocentese, os animais evoluíram para óbito.

O débito urinário não foi mensurado, porém notou-se que parte dos animais recuperou a continência urinária, uma vez que a bexiga encontrava-se vazia no momento dos esvaziamentos vesicais manuais. A recuperação não foi observada nos animais do Grupo A (controle), mas foi verificada em 66,66% (n=14) dos animais do grupo B, e em 61,9% (n=13) dos animais do Grupo C (Figura 3.9).

A recuperação da continência urinária nos grupos B e C ocorreram nove dias, em média, após o segundo transplante. Houve diferença significativa entre os grupos em relação à incontinência e nos Grupos B e C verificou-se uma melhor

resposta do que no grupo A ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre os Grupos B e C ($p > 0,05$).

3.4.4 Avaliação motora dos membros pélvicos

Antes da indução do trauma medular 100% ($n=63$) dos animais apresentavam deambulação normal, que corresponde à pontuação 21 (máxima) da escala BBB.

Após a indução do trauma medular, todos os animais apresentaram paraplegia, que corresponde à pontuação zero (mínima) da escala BBB. Os animais do Grupo A mantiveram o quadro de paraplegia durante os 90 dias do estudo, porém cinco animais (23,8%) do Grupo B e quatro (19,0%) do Grupo C apresentaram melhora parcial da motricidade (Figura 3.9). Para estes animais a melhora foi gradativa e linear, não ocorrendo retrocesso do quadro locomotor.

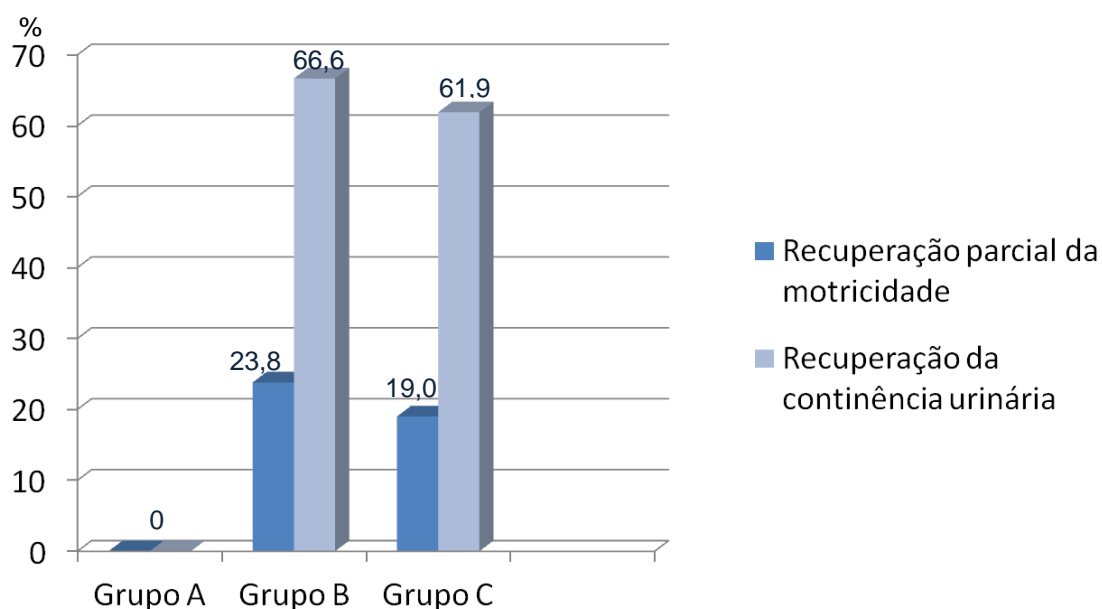


Figura 3.9- Avaliação motora e da continência urinária em ratos submetidos à trauma medular, após duas aplicações de meio de cultura (Grupo A), ou duas aplicações de células-tronco (Grupo B), ou uma aplicação de corticoide associada a duas aplicações de células-tronco (Grupo C).

O início da recuperação parcial da motricidade nos animais do Grupo B ocorreu, em média, 11 dias após o segundo transplante. O melhor escore (mediana de 5,5) deste grupo ocorreu, em média, após 21 dias do segundo transplante. No grupo C o início da recuperação parcial da motricidade ocorreu, em média, nove dias após o segundo transplante. O melhor escore (mediana de 5,0) ocorreu, em média, após 17 dias do segundo transplante (Tabela 3.1). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos que recebem células-tronco (B e C) em relação à motricidade, porém houve diferença na motricidade quando se compararam os grupos B e C com A ($p<0,01$).

Tabela 3.1 – Avaliação motora utilizando a escala BBB (BASSO et al., 1995) ao longo de 90 dias de análise de ratos submetidos à trauma medular, após duas aplicações de meio de cultura (Grupo A), ou duas aplicações de células-tronco (Grupo B), ou uma aplicação de corticoide associada a duas aplicações de células-tronco (Grupo C).

Grupo Experimental	Escore BBB antes da lesão medular	Escore BBB pós-lesão medular	Mediana de escores BBB após estabilização locomotora	Início da recuperação motora (médias em dias)	Término da recuperação motora (médias em dias)
Grupo A n = 21 / 100%	21	0	0	Não ocorreu	-
Grupo B* (n=5 / 23,8%)	21	0	5,5	11	21
Grupo C* (n=4 / 19,0%)	21	0	5,0	9	17

* $p<0,01$ em relação ao grupo A.

Grupo A = grupo controle; Grupo B = grupo células-tronco; Grupo C = grupo células-tronco associadas à corticoterapia.

3.4.5 Avaliação pós-transplante das CTDAh por bioluminescência

A avaliação da intensidade de bioluminescência é uma ferramenta para confirmar o sucesso do transplante, tornando possível avaliar, de forma não invasiva, a sobrevivência e distribuição das CTDAh transplantadas *in vivo*. Estas células foram transduzidas e a avaliação *in vitro* demonstrou que o protocolo utilizado foi efetivo (Figura 3.10).

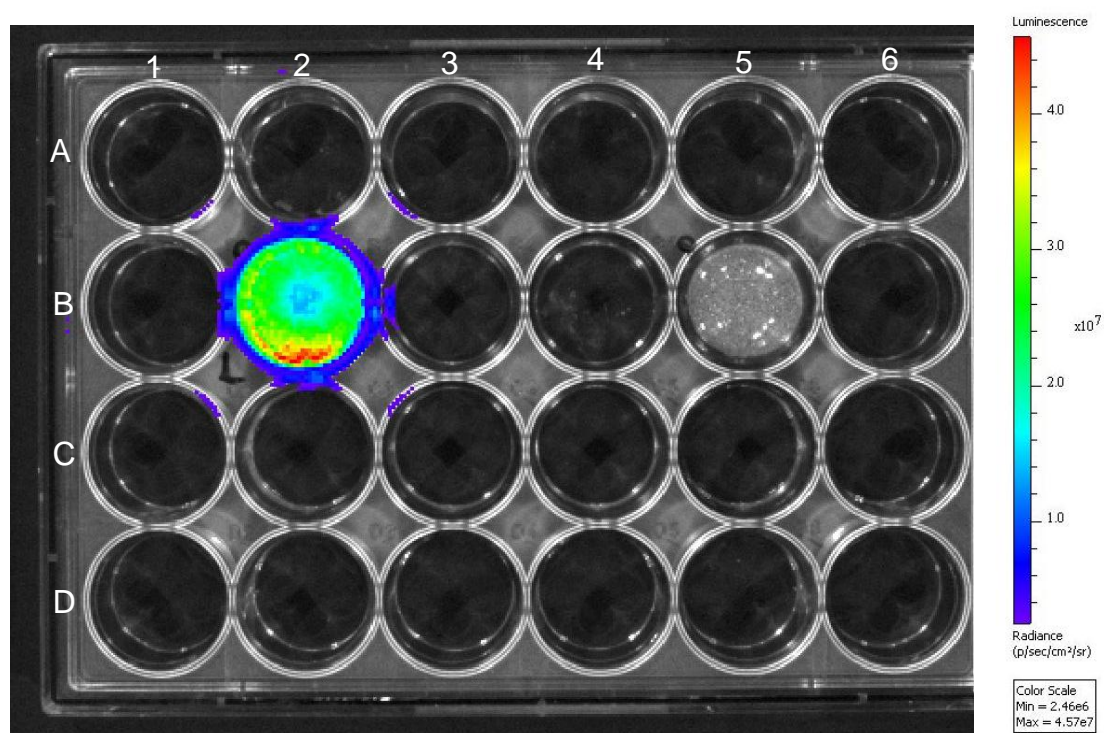


Figura 3.10- Sinal de bioluminescência das CTDAh transduzidas. Imagem *in vitro*, placa contendo células-transduzidas na presença de luciferase (2B) e poço controle, células transduzidas na ausência de luciferase (5B).

Cinco minutos após os transplantes, a localização e sobrevivência das CTDAh foram avaliadas por imagens de bioluminescência *in vivo* em animais dos grupos B (n= 5) e C (n=4), animais do Grupo A não foram avaliados porque não receberam células, apenas meio de cultura. As análises das imagens por bioluminescência revelaram a distribuição celular e a intensidade do sinal (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Avaliação por bioluminescência do fluxo total (fótons/segundo) de ratos submetidos à trauma medular e duas aplicações de células-tronco (Grupo B), ou uma aplicação de corticoide associada a duas aplicações de células-tronco (Grupo C).

Grupo Experimental	Média do fluxo total no primeiro transplante (7ºd pós-lesão)	Média do fluxo total no segundo transplante (14ºd pós-lesão)
Grupo B* (n=5 / 23,8%)	$6,06 \times 10^7 \pm 4,06 \times 10^7$	$2,46 \times 10^7 \pm 3,64 \times 10^7$
Grupo C** (n=4 / 19,0%)	$4,17 \times 10^7 \pm 4,52 \times 10^7$	$1,10 \times 10^8 \pm 8,04 \times 10^8$

* Grupo célula-tronco; ** Grupo célula-tronco associada à corticoterapia.

Em ambos os grupos (B e C), na maioria dos animais, as células transplantadas estavam distribuídas ao longo do espaço epidural e migraram para o sítio da lesão. Na avaliação, foi observado um sinal intenso de bioluminescência no local da infusão de células, indicando a presença das células no local do transplante (Figura 3.11).

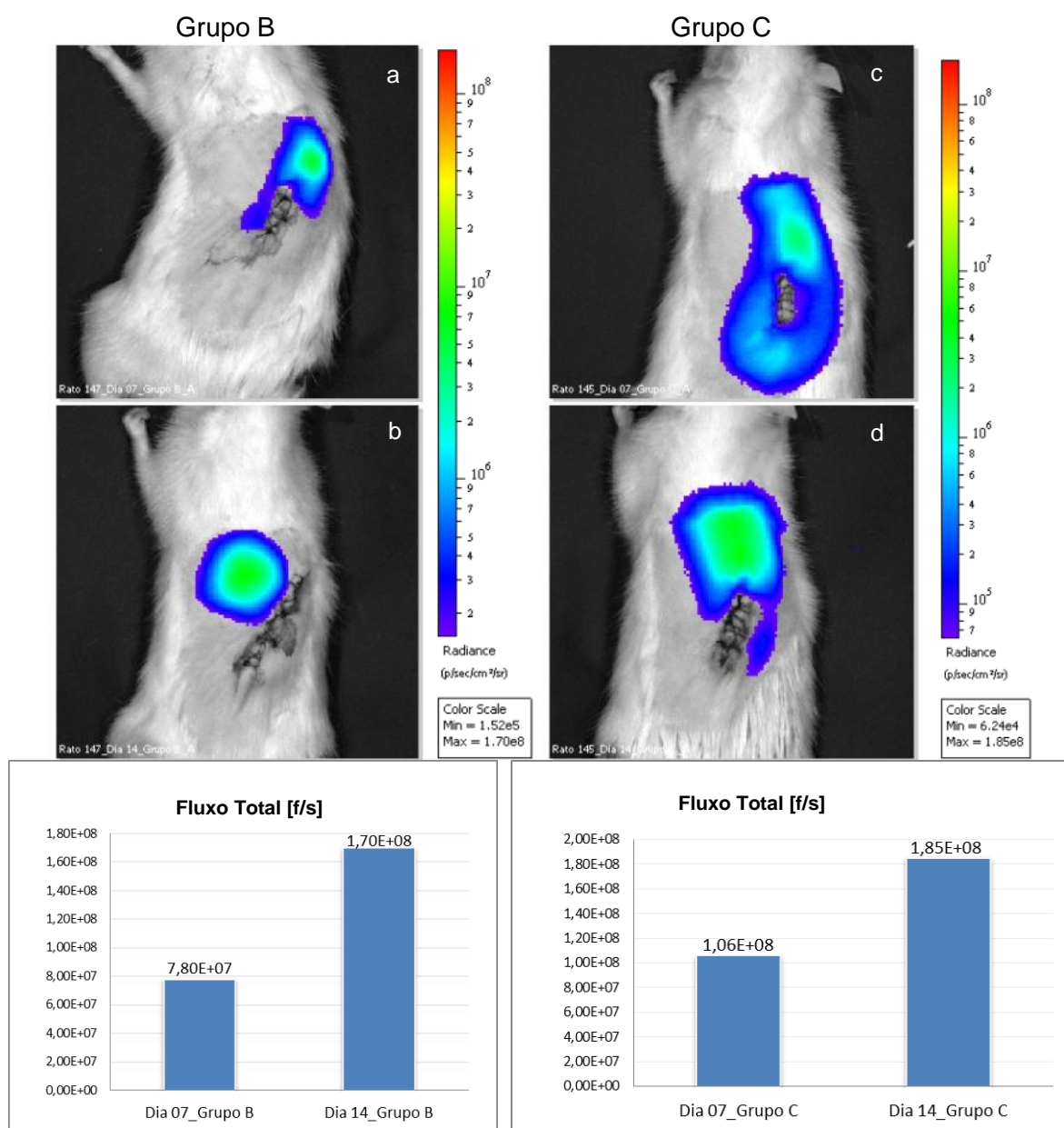


Figura 3.11- Imagens de bioluminescência. Sinal de bioluminescência das CTDAh transduzidas transplantadas no espaço epidural de ratos adultos, sete e quatorze dias após a lesão medular. Animais representativos dos grupos B e C. Presença das células no local do transplante após a primeira infusão de células (7º dia após lesão medular) (A). Gráficos demonstrando a média da contagem de fótons/segundo nestes animais (B).

Em dois animais do Grupo B e em um animal do Grupo C foi observada a presença de CTDAh nos pulmões (fig. 3.12).

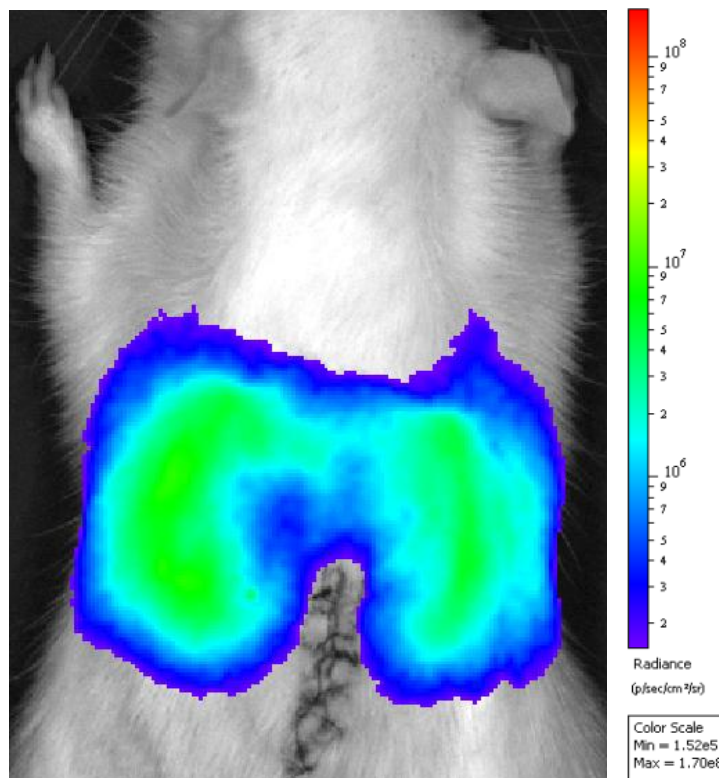


Figura 3.12- Imagem de bioluminescência nos pulmões. Sinal de bioluminescência das CTDAh transduzidas transplantadas no espaço epidural e presentes nos pulmões de rato adulto, sete dias após a lesão medular. Animal representativo do grupo B. Presença das células nos pulmões após a primeira infusão de células (7° dia após lesão medular).

Em um dos animais do grupo C, após a análise do sinal de bioluminescência *in vivo*, no 16° dia após a lesão medular, o animal foi a óbito e a medula espinhal foi extraída. Nova análise foi realizada demonstrando a presença das CTDAh no local da lesão (Figura 3.13).

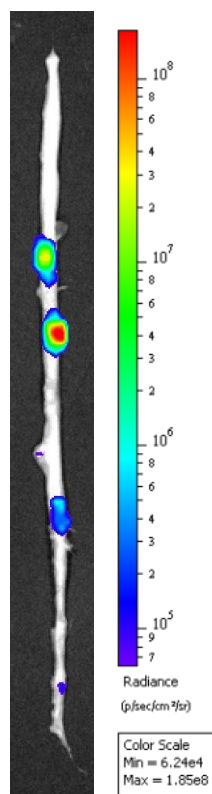


Figura 3.13- Análise do sinal de bioluminescência da medula espinhal de um animal do grupo C, que foi a óbito no 16º dia após lesão medular. Nota-se intensa adesão das células em áreas com lesão medular.

Logo após o primeiro transplante (7º dia pós-lesão) não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) na emissão de fluxo total (fótons/segundo) entre os Grupos B e C (Figura 3.14).

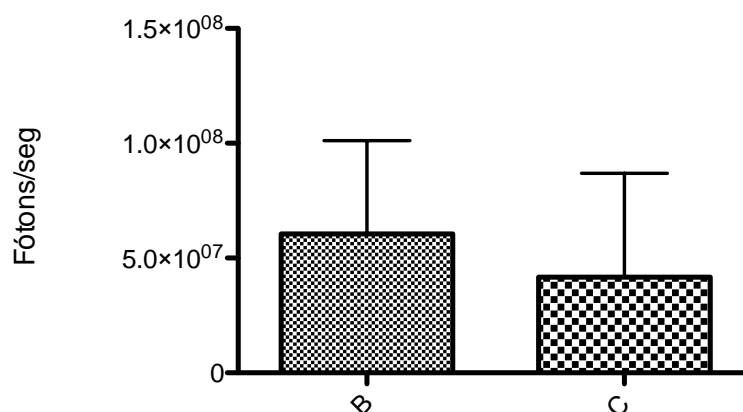


Figura 3.14- Resultados referentes à emissão do fluxo total (fótons/segundo) dos Grupos B e C após o primeiro transplante de células transduzidas.

Na mensuração da emissão de fluxo total (fótons/segundo) após o segundo transplante (14° dia pós-lesão) não ocorreu diferença significativa ($p>0,05$) entre os Grupos B e C (Figura 3.15). O Grupo C emitiu maior intensidade de sinal, representada pelo maior número de fótons/segundo.

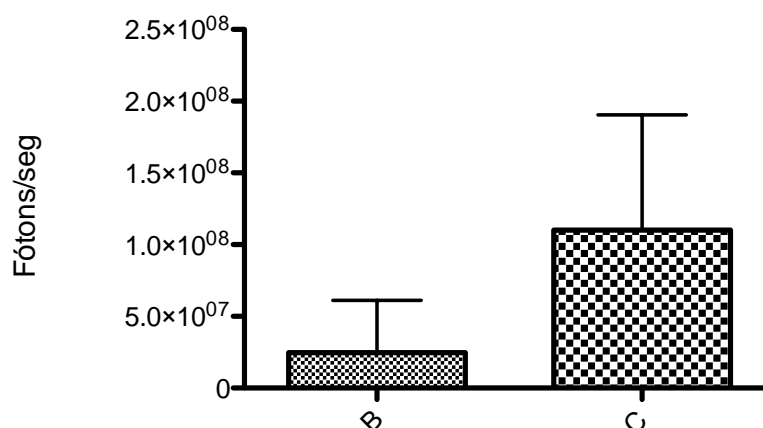


Figura 3.15- Resultados referentes à emissão do fluxo total (fótons/segundo) dos Grupos B e C após o segundo transplante de células transduzidas.

Na comparação entre o primeiro e o segundo transplante dos animais do Grupo B (Figura 3.16) e do Grupo C (Figura 3.17), percebeu-se que não ocorreu diferença significativa entre os transplantes, a intensidade de sinal, representada por fótons/segundo foi estatisticamente similar.

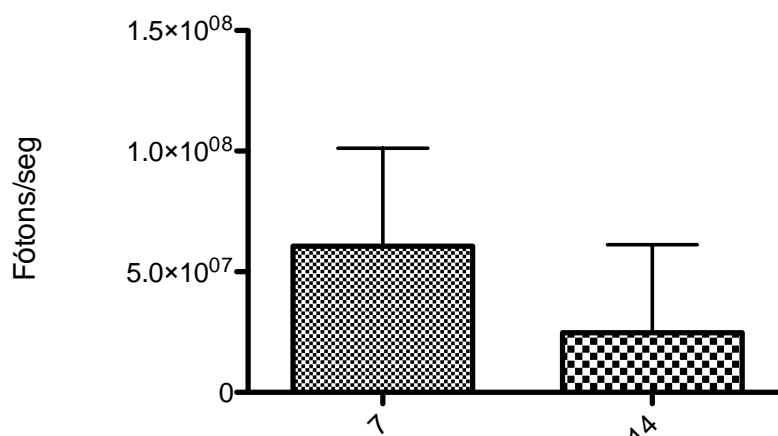


Figura 3. 16- Resultados referentes à emissão do fluxo total (fótons/segundo) após o 1° e 2° transplantes nos animais que receberam células transduzidas do Grupo B.

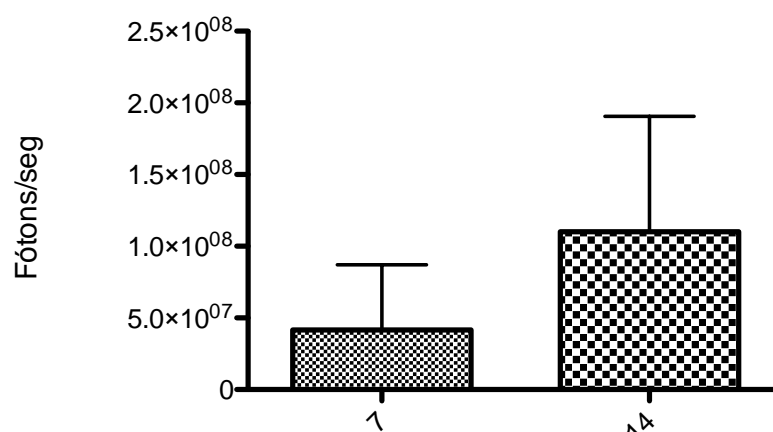


Figura 3.17- Resultados referentes à emissão do fluxo total (fótons/segundo) após o 1º e 2º transplantes nos animais que receberam células transduzidas do Grupo C.

3.4.6 Avaliação histológica da bexiga urinária

3.4.6.1 Imagem histopatológica da bexiga urinária

Os espécimes das bexigas urinárias estavam histologicamente similares nos Grupos A (Figura 3.18), B (Figura 3.19) e C (Figura 3.20). A submucosa foi distinguida da mucosa pela lâmina muscular da mucosa. O músculo liso que compreende a túnica muscular (músculo detrusor) era mais oblíquo, entrelaçado e escasso em camadas circulares específicas. Neoformações vasculares e áreas de necrose ou de hemorragia não foram observadas. Os infiltrados inflamatórios foram ocasionais.

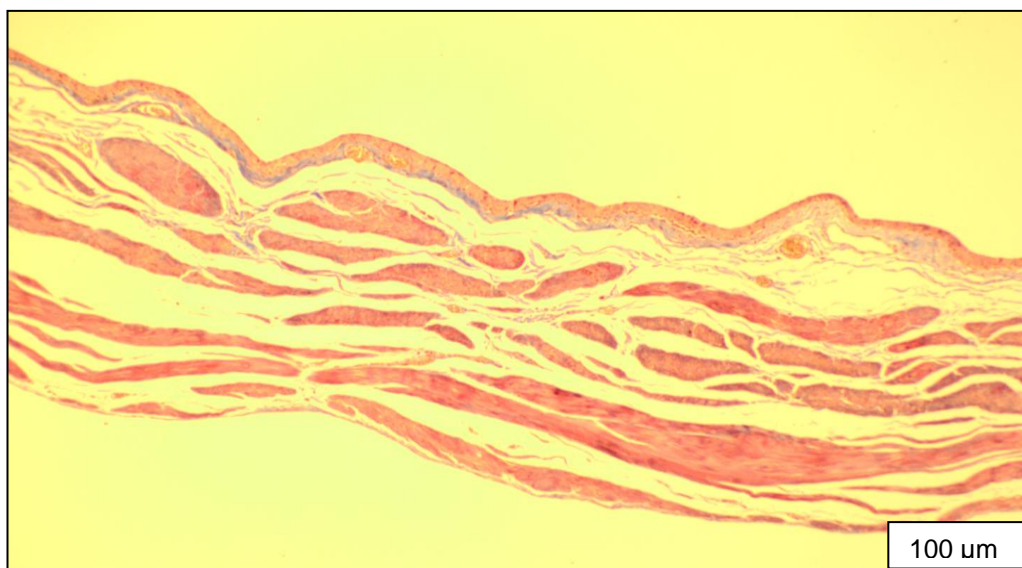


Figura 3.18- Aspecto histológico de corte transversal de bexiga urinária de rato submetido à lesão medular, pertencente ao Grupo A (Controle). Notam-se aspectos de normalidade. Coloração de HE.

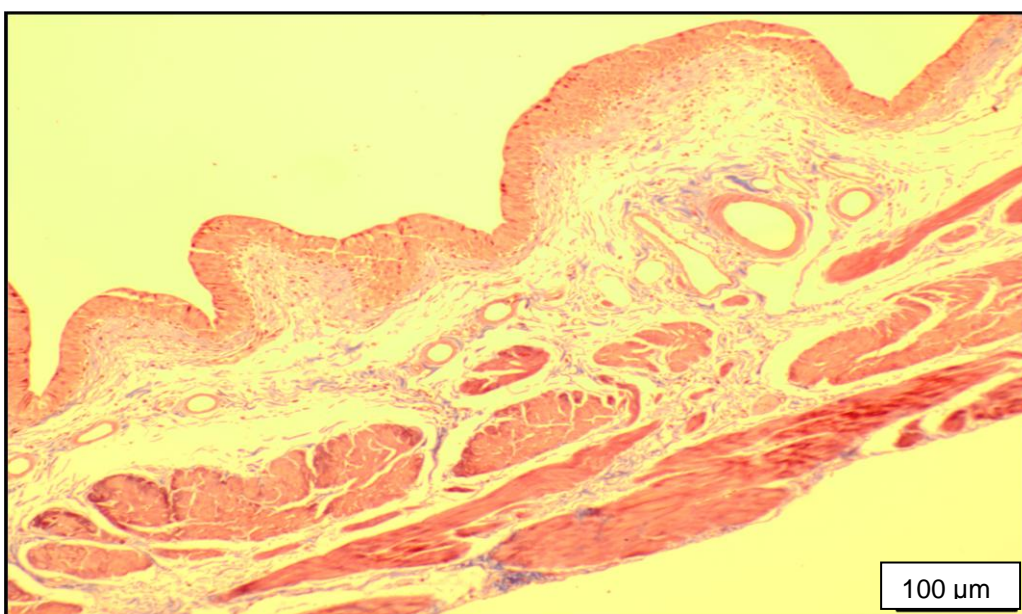


Figura 3.19- Aspecto histológico de corte transversal de bexiga urinária de rato submetido à lesão medular, pertencente ao Grupo B (Grupo células-tronco). Notam-se aspectos de normalidade. Coloração de HE.

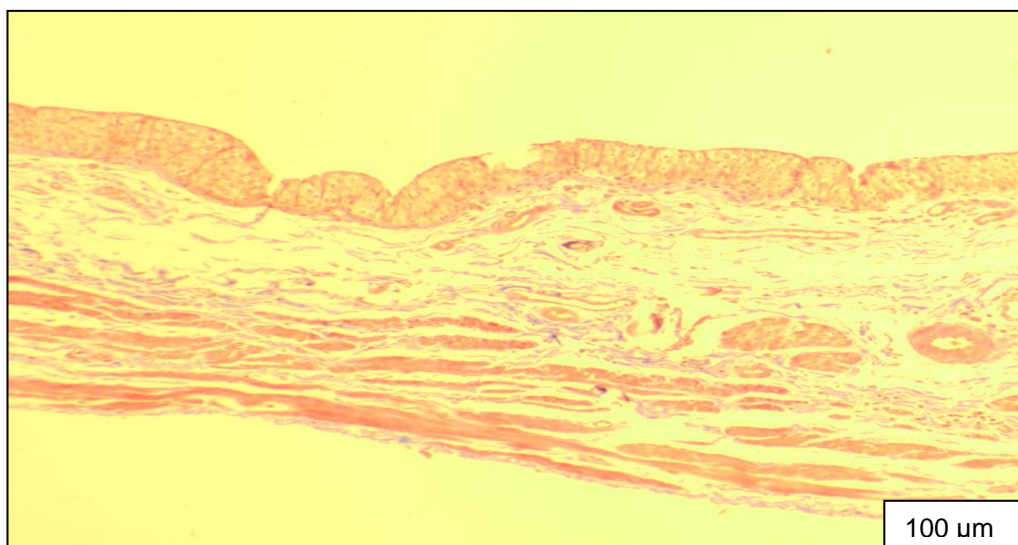


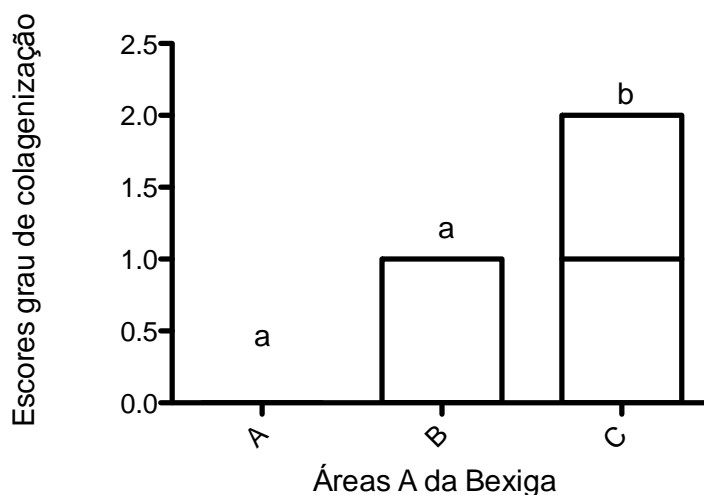
Figura 3.20- Aspecto histológico de corte transversal de bexiga urinária de rato submetido à lesão medular, pertencente ao Grupo C (Grupo corticoterapia e células-tronco). Notam-se aspectos de normalidade. Coloração de HE.

3.4.6.2 Grau de collagenização da parede vesical

Foram analisadas oito áreas da bexiga urinária, sendo quatro do colo vesical (região A) e quatro do corpo da bexiga urinária (região B).

Todos os animais apresentaram deposição de colágeno. Em todos os grupos ocorreu predomínio do grau leve de collagenização: deposição de fibras colágenas em pequena quantidade, caracterizadas por fibras depositadas em meio aos fibroblastos proliferados.

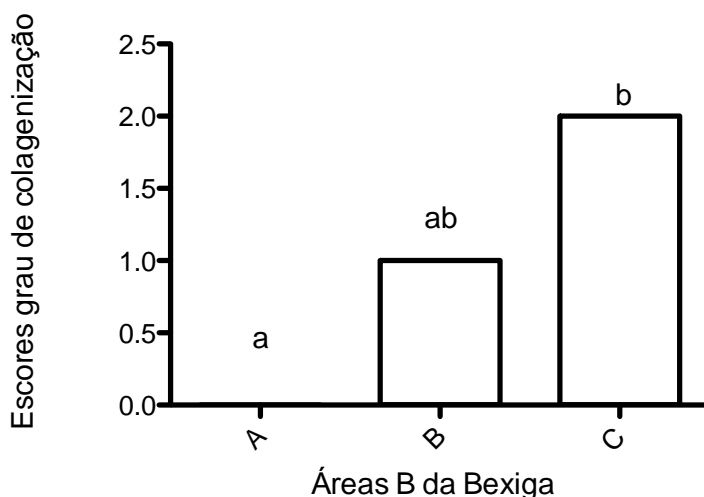
Na região A não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos A e B, mas ocorreu diferença significativa ($p < 0,001$) quando o Grupo C foi comparado aos Grupos A e B. (Figura 3. 21).



Letras diferentes $p < 0,001$

Figura 3.21- Resultados referentes aos graus de colagenização da região A da bexiga urinária de ratos submetidos à trauma medular dos Grupos A (grupo controle); Grupo B (Grupo células-tronco) e Grupo C (Grupo corticoterapia e células-tronco). Teste de Kruskal-Wallis, com posterior teste de Dunn's. Os dados foram demonstrados em medianas.

Na região B não ocorreu diferença significativa entre os grupos A e B ($p > 0,05$), e B e C ($p > 0,05$), mas ocorreu, diferença significativa ($p < 0,05$) entre os Grupos A e C (Figura 3.22).



Letras diferentes $p < 0,05$

Figura 3.22- Resultados referentes aos graus de colagenização da região B da bexiga urinária de ratos submetidos à trauma medular dos Grupos A (grupo controle); Grupo B (Grupo células-tronco) e Grupo C (Grupo corticoterapia e células-tronco). Teste de Kruskal-Wallis, com posterior teste de Dunn's. Os dados foram demonstrados em medianas.

3.4.6.3 Aferição da espessura da parede vesical

Com o uso do *Software* DP2-BSW OLYMPUS, as imagens das lâminas histológicas foram digitalizadas, e com o uso do *Software* IMAGE PRO-PLUS oito espessuras de parede vesical foram mensuradas, sendo quatro da região do colo vesical (região A) e quatro da região do corpo (região B).

Foi realizada a soma das oito espessuras, e estatisticamente não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) entre as espessuras vesicais dos animais dos Grupos A, B e C (Figura 3.23).

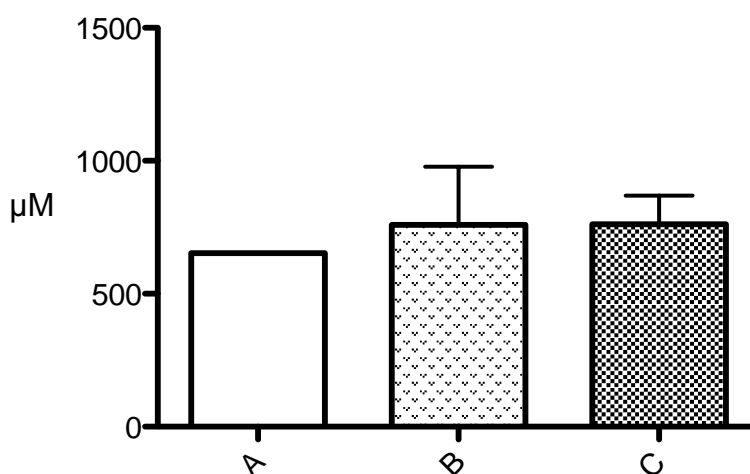


Figura 3.23– Resultados referentes às espessuras das Regiões A e B das bexigas urinárias de ratos submetidos à trauma medular dos Grupos A (grupo controle); Grupo B (Grupo células-tronco) e Grupo C (Grupo corticoterapia e células-tronco). Para análise dos dados de espessura da bexiga foi utilizado ANOVA (one-way) seguido de teste de Bonferroni. ($\alpha = 0,05$).

3.4.7 Avaliação histológica da medula espinhal

3.4.7.1 Imagem histopatológica da medula espinhal

Nos cortes histológicos do epicentro das lesões medulares dos Grupos A, B e C verificou-se corpos neuronais distribuídos de modo irregular, áreas de necrose, vacuolização, diminuição de neurônios motores e ruptura do parênquima medular (Figura 3.24). Nas medulas espinhais dos grupos B e C foi observada com maior

facilidade a substância branca, organizada em feixes de fibras nervosas ascendentes e descendentes, e apenas algumas dessas fibras ingressando na substância cinzenta. Contudo, foi possível observar a substância cinzenta como um H disforme. Os cornos medulares foram identificados apesar de também estarem disformes.

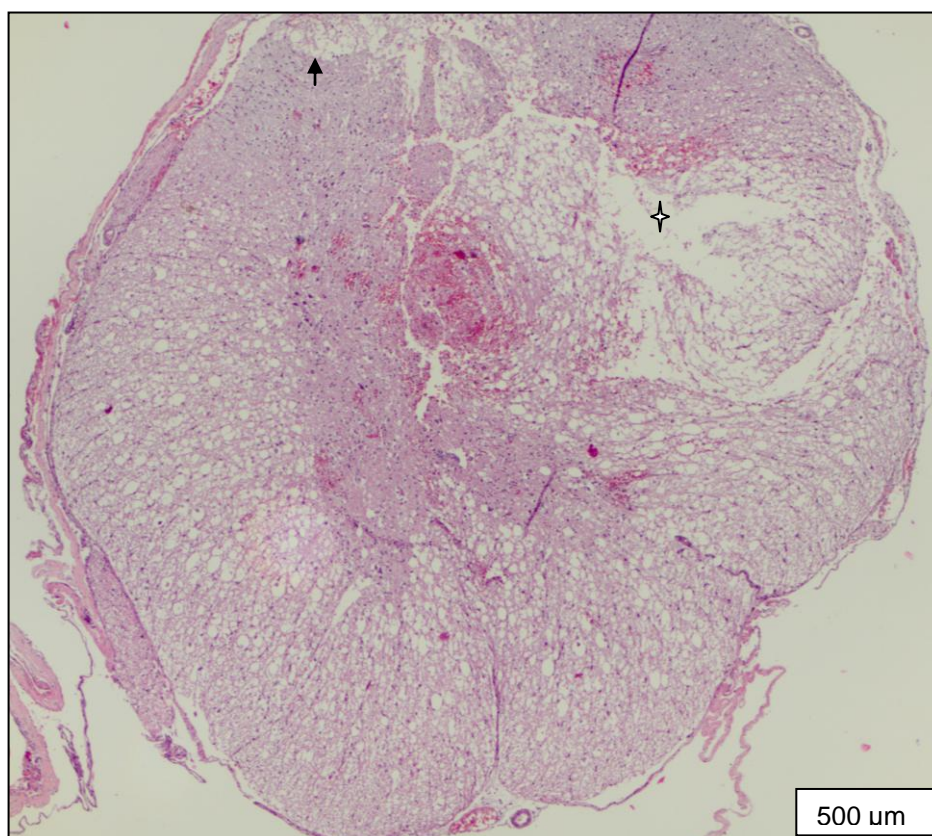


Figura 3.24- Corte histológico de medula espinhal de rato submetido à trauma medular. No epicentro da compressão medular nota-se necrose e vacuolização (seta), corpos neuronais distribuídos de modo irregular, diminuição de neurônios motores e ruptura do parênquima medular (estrela).

As análises histológicas do epicentro da lesão das medulas espinhais revelaram maior percentual de tecido lesado e menor concentração de neurópilos nos animais do Grupo A (Figura 3.25), se comparados aos dos Grupos B (Figura 3.26) e C (Figura 3.27).

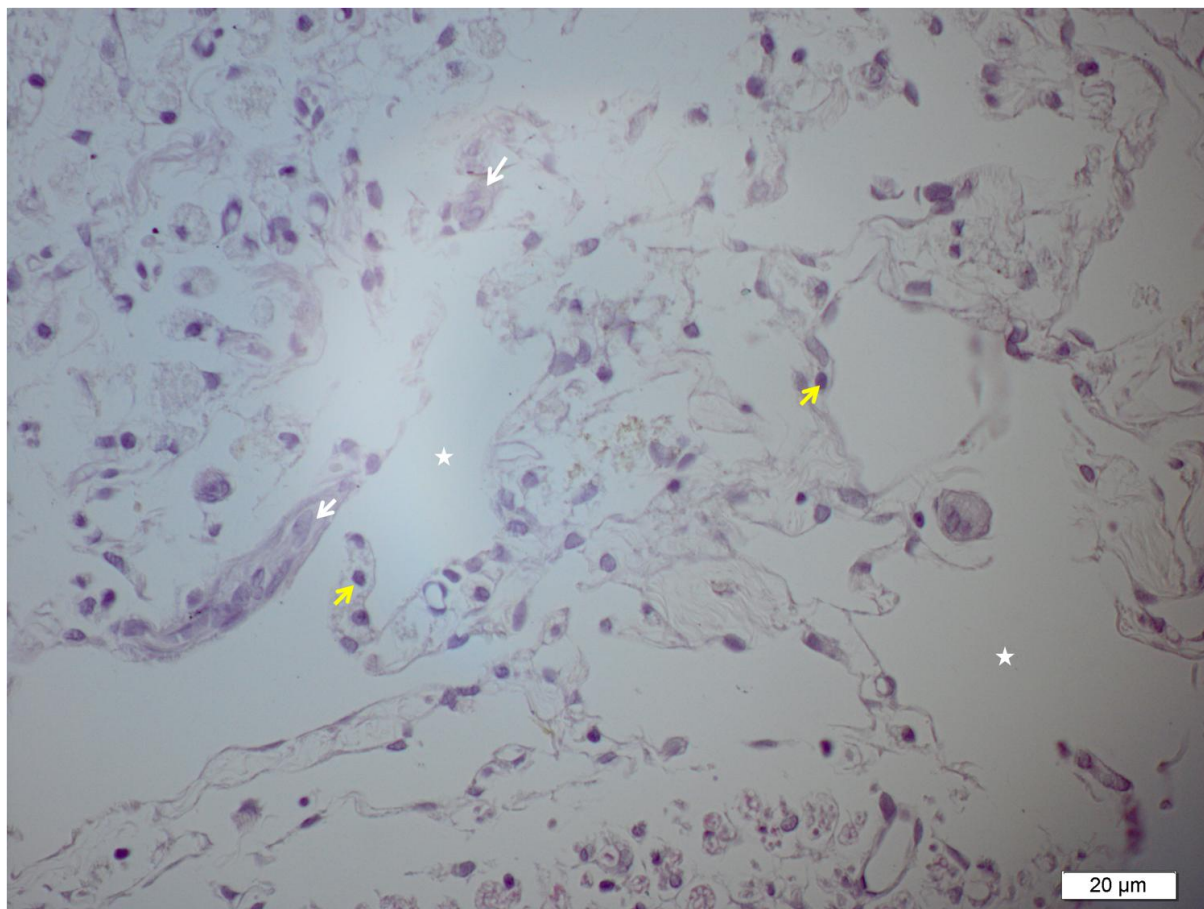


Figura 3.25- Aspecto histológico de corte transversal do epicentro da lesão medular de animal pertencente ao Grupo A. Notam-se corpos neuronais distribuídos de forma irregular (setas amarelas) e significativos espaçamentos na substância branca compatíveis com necrose (estrelas) e pouca concentração de neurópilos (setas brancas). Coloração HE. 400x.

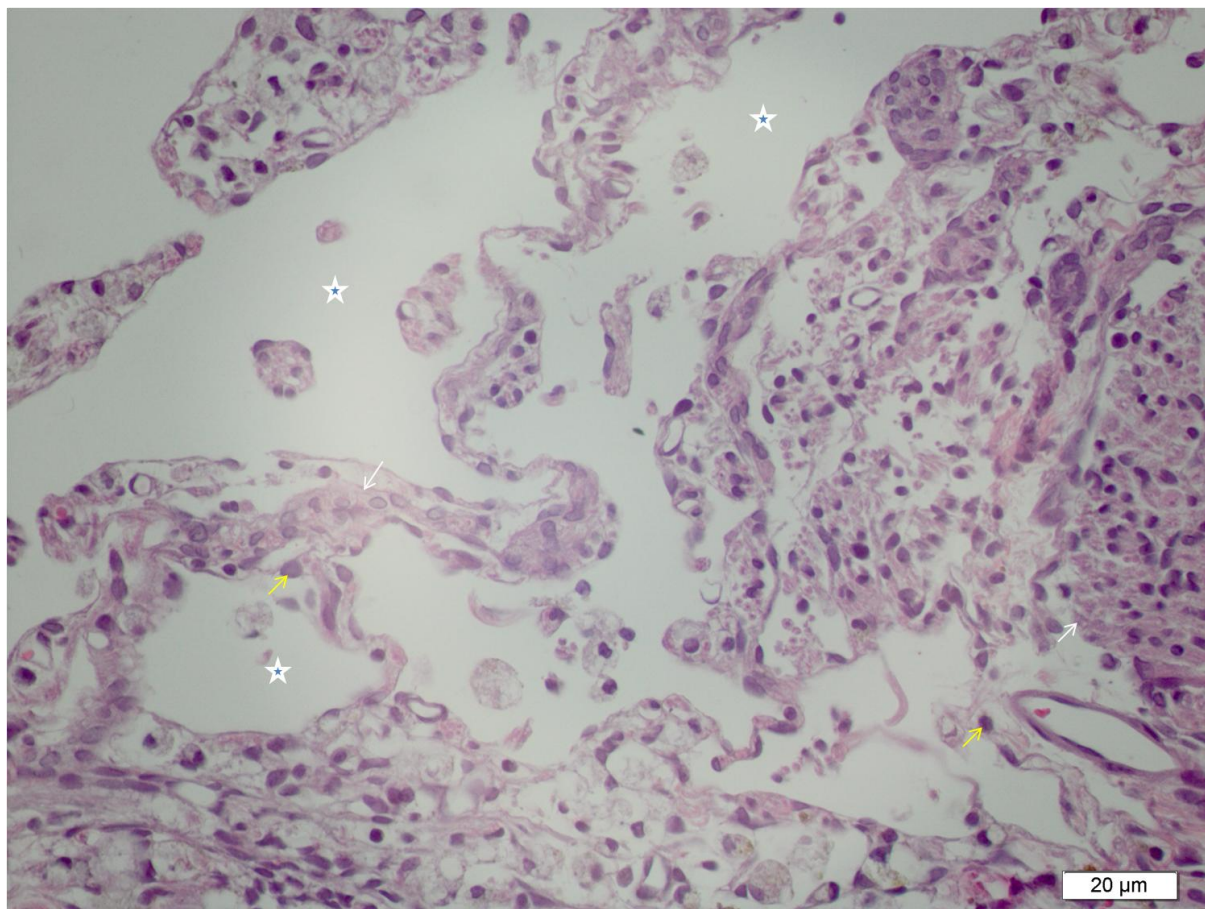


Figura 3.26- Aspecto histológico de corte transversal do epicentro da lesão medular de animal pertencente ao Grupo B. Notam-se corpos neuronais distribuídos de forma irregular (setas amarelas) e espaçamentos na substância branca compatíveis com necrose (estrelas) e pouca concentração de neurópilos (seta branca). Coloração HE. 400x.

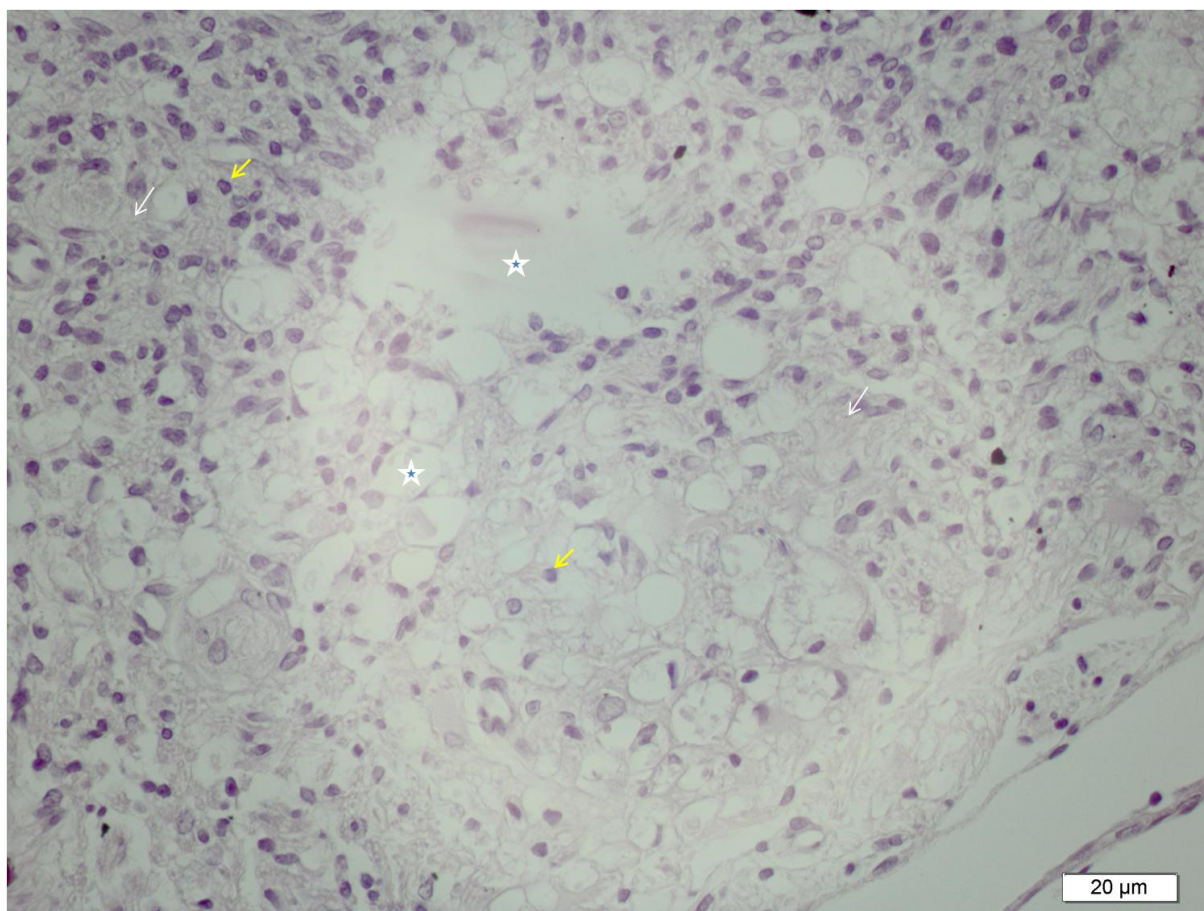


Figura 3.27- Aspecto histológico de corte transversal do epicentro da lesão medular de animal pertencente ao Grupo C. Notam-se corpos neuronais distribuídos de forma irregular (seta amarela) e espaçamentos na substância branca compatíveis com necrose (estrelas) e pouca concentração de neurópilos (setas brancas). Coloração HE. 400x.

3.4.7.2 Aferição da área medular

Com o uso do *Software* DP2-BSW OLYMPUS, as imagens das lâminas histológicas foram digitalizadas, e as áreas das medulas espinhais foram aferidas com o uso do *Software* IMAGE PRO-PLUS.

Os cálculos das áreas medulares de animais dos Grupos A, B e C revelaram que não ocorreu diferença significativa entre eles (Figura 3.28).

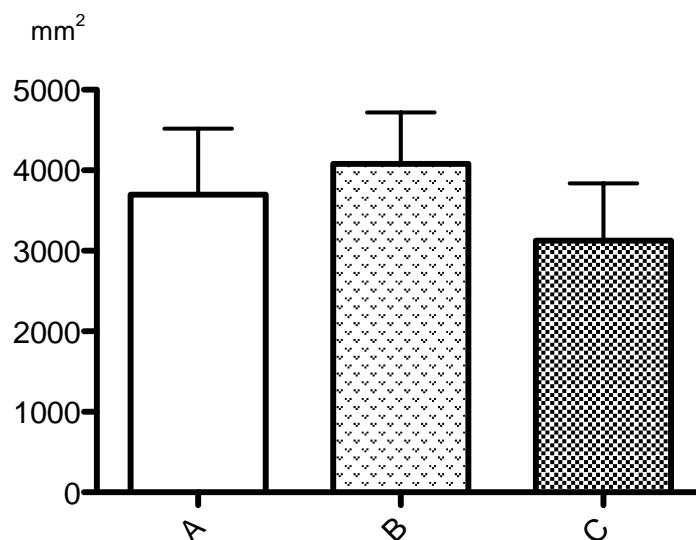


Figura 3.28- Resultados referentes às áreas medulares de ratos submetidos à trauma medular dos Grupos A (grupo controle); Grupo B (Grupo células-tronco) e Grupo C (Grupo corticoterapia e células-tronco). Para análise dos dados das áreas medulares foi utilizado ANOVA (one-way) seguido de teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi 5% ($\alpha=0,05$).

3.5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi realizado o isolamento e cultivo das CTDAh humanas para aplicação em modelo de lesão espinhal compressiva. As CTDAh foram isoladas utilizando o método de digestão enzimática, conforme Strutt et al. (1996). As viabilidades celulares obtidas no primeiro e segundo transplantes estão de acordo com os estudos de Rebelatto et al. (2008).

Os preceitos de padronização da genética, estado sanitário e do ambiente da espécie analisada, a observação de condições adequadas no transporte, aclimatação, enriquecimento do ambiente, treinamento de técnicos em experimentação animal, gestão de informação, biossegurança, dieta, anestesia, cuidados pós-operatórios, analgesia e eutanásia foram seguidos neste estudo. Estas etapas fundamentais visaram à obtenção de resultados com alto grau de acuidade, alto nível de reprodutibilidade e precisão. Os preceitos seguidos neste estudo foram

baseados em Damy et al. (2010), que com o objetivo de contribuir à pesquisa em cirurgia experimental, apresentaram uma análise dos principais parâmetros exigidos a serem observados pelos comitês nacionais e internacionais de ética e bem-estar animal, cujo cumprimento é pré-requisito para publicação em periódicos de circulação internacional.

O modelo experimental de lesão medular aplicado foi similar ao usado por Leal Filho et al. (2005) e Carvalho (2011), e mostrou-se simples, econômico, eficaz e reprodutível. Foi critério de inclusão a paraplegia em todos os animais, e conforme ocorrido nos estudos de Silva (2012), se o preenchimento do balão do cateter Fogarty for de 80 μ L de volume de solução salina durante 5 minutos, ocorrerá paraplegia sem melhora espontânea e progressiva.

A compressão de 80 μ L durante 5 minutos causou em todos os animais edema pulmonar neurogênico, sendo causa de óbito em 35,3%. Esta intercorrência ocorre devido à grande ativação simpática que causa aumento de pressão arterial, ativação barorreflexa e redistribuição de sangue dos vasos esplâncnicos para o leito vascular pulmonar (ŠEDÝ et al. 2009).

A mortalidade verificada neste estudo foi considerada de índice médio, porém sem inviabilizar o modelo de lesão medular, pois resultou em paraplegia em todos os animais sem melhora espontânea e progressiva.

Outra causa de óbito foi consequente à retenção urinária (2,9%), casuística similar à encontrada por Silva (2012) que teve 42,5% de óbito, sendo 30% por edema pulmonar neurogênico e 12,5% por retenção urinária. O modelo de lesão medular foi idêntico, ambos usaram cateter Fogarty n° 3, compressão com 80 μ L durante 5 minutos, com lesões produzidas em região toracolombar. Nesta região há predomínio de neurônios motores superiores (NMS) que são responsáveis pela

modulação sináptica da região, e que normalmente possuem efeitos inibitórios. Se lesados e de acordo com a gravidade da lesão, clinicamente percebe-se espasticidade de membros e de esfíncteres, inclusive os vesicais, razão pela qual pode ocorrer incontinência urinária por retenção com hiperfluxo (SHARP e WHEELER, 2005).

Além da retenção urinária, foi observada a presença de hematúria por um período de, em média, quatro dias. Esta atribui-se a ruptura de vasos vesicais, distensão da parede vesical, somada ao aumento da pressão intravesical gerada pela compressão manual necessária ao esvaziamento. As alterações histológicas na fase aguda da lesão medular evidenciam importante comprometimento vesical, sendo essa uma alteração sistêmica de relevância em lesados medulares (MEYER et al. 2003).

Antibioticoterapia e compressões vesicais diárias foram suficientes para evitar cistites bacterianas e alterações histológicas, resultados que corroboram aos encontrados por Kaminski (2011), Rodrigues et al. (2011) e Silva (2012).

A cateterização é tecnicamente difícil em ratos, especialmente em fêmeas. Foi optado por este sexo porque são menos agressivas e mais fáceis de manusear durante as compressões vesicais manuais, considerações que confirmam as análises de Mert et al. (2011).

Os corticoides como o succinato sódico de metilprednisolona, são amplamente utilizados no tratamento da lesão medular, apesar dos mecanismos de ação não serem bem entendidos, nem totalmente aceitos. Esta classe medicamentosa é considerada tratamento padrão para a lesão medular aguda em humanos e pacientes veterinários (RABCHEVSKY et al., 2002; ARIAS et al., 2007; GREEN e BOSCO, 2008; WEBB et al., 2010). A dose e a via de administração

usadas neste estudo foram as mesmas usadas por Tebet et al. (2003) e Carvalho et al. (2011). Tebet et al. (2003) perceberam melhora da função locomotora em comparação com o grupo controle, diferente dos resultados relatados por Carvalho (2011). Vialle et al. (2007) fizeram uso de corticoide em rato Wistar com lesão medular e perceberam que a corticoterapia não contribui na preservação de tecido neuronal.

Para Fitzmaurice (2011) e Kaminski (2011), os tratamentos farmacológicos existentes para a lesão medular são paliativos, não sendo capazes de reverter o dano neurológico, pois não possuem efeito neuroregenerativo. Estudos comprovam a capacidade das CTM em estimular a remielinização e a angiogênese (POLL et al., 2008; MEIRELLES et al., 2009; UCCELLI et al., 2011; QUERTAINMONT et al., 2012). Outros ainda comprovam que as CTM são capazes de se diferenciarem em células neuronais não somente *in vitro*, mas também *in vivo* após o transplante (GRECO et al., 2008; XU et al., 2010), o que a torna o transplante de CTM uma opção viável para a substituição de neurônios lesados.

Contudo, ainda é vista como uma terapia ainda não consolidada (KAMINSKI, 2011). Neste estudo, apesar do uso de células heterólogas, observou-se discreta melhora da funcionalidade locomotora, resultados também observados por Azari et al. (2010), Pal et al. (2010) e Rodrigues (2011); e por Carvalho (2011) e Kaminski (2011) com células autólogas.

O presente estudo demonstrou que houve melhora clínica nos ratos que receberam transplante de células no sétimo e décimo quarto dias após a lesão medular, indicando que a resposta inflamatória aguda pós-lesão não afetou as células transplantadas (HOFSTETTER et al, 2002; PAL et al., 2010). E que possivelmente, conforme os estudos de Quertainmont et al. (2012) e Araújo (2013)

ocorreu nos animais que receberam transplante de células atenuação significativa da resposta inflamatória; diminuição da imunorreatividade dos astrócitos e maior ativação de células-tronco endógenas.

Kurozumi et al., (2004), Lu et al., (2005) e Quertainmont et al., (2012), provaram que CTM são capazes de secretar fatores de crescimento e citocinas, como o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além do aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias como IFN- γ e IL-10. Estas citocinas e fatores tróficos podem ter um efeito benéfico após a lesão espinhal sobre a reparação e reorganização das conexões neuronais; na indução de regeneração; no estímulo a neurogênese; no crescimento axonal; na redução da resposta inflamatória e na proteção do tecido.

A redução significativa da reatividade dos astrócitos nos animais tratados com CTM, observado por Araújo (2013) sugere que as CTM podem ter reduzido a resposta dos astrócitos; e por conseqüência, podem agir reduzindo os efeitos inibitórios do tecido cicatricial proporcionando um ambiente mais permissivo para a extensão axonal.

Segundo Ronaghi et al. (2010), o recrutamento de células-tronco neurais endógenas pode ser uma alternativa para o tratamento da lesão medular, por ser uma estratégia não invasiva e que evita a necessidade de imunossupressão. Araújo (2013) mostrou através de seus estudos que os grupos tratados com as CTM apresentaram quantidade maior de células-tronco neurais no local da lesão do que nos grupos controles. Assim, o transplante de CTM pode ter influenciado o ambiente de lesão para fornecer fatores de crescimento e sinalização para a proliferação de células-tronco endógenas conforme preconizado por Urdzikova et al. (2006) e Rossi

et al. (2010). Wu et al. (2003) mostraram a recuperação funcional após o transplante de CTM no momento da lesão e atribuiu isso a diferenciação aumentada de células-tronco neurais endógenas.

Neste estudo a recuperação motora foi precoce e significativamente melhor em grupos tratados com CTMh, resultados que corroboram os estudos de Cho et al. (2009), que indicam que a ação parácrina é a principal contribuição desta modalidade terapêutica.

As análises morfométricas do presente estudo não indicaram diferenças significativas sobre a área de lesão nos animais tratados com CTM. Resultados semelhantes foram descritos por Yoshihara et al. (2006), Abrams et al. (2009) e Araújo (2013) que também não observaram redução significativa do tamanho da lesão decorrentes do trauma medular em ratos tratados com CTM. Em contrapartida, outros estudos relataram redução significativa da área de lesão e maior preservação da substância branca em animais tratados, indicando efeito neuroprotetor dessas células (ANKENY et al., 2004; BAKSHI et al., 2006; URDZIKOVA et al., 2006).

Foi demonstrado que é possível utilizar a bioluminescência para monitorar as células transplantadas de uma forma não invasiva na medula espinhal do rato lesionado. No presente estudo verificou-se migração e adesão das células transplantadas para o local lesionado, porque nas análises de bioluminescência *in vivo* e na medula espinhal analisada após 48h do transplante observou-se grande intensidade de fluorescência. A migração de células para o local da lesão também foi relatada por Pal et al. (2010). Os resultados de bioluminescência foram similares aos relatados por Okada et al. (2005) e Roet et al. (2012).

Após o segundo transplante de CTDAh transduzidas (14º dia após a lesão medular), nos animais do grupo C, o sinal de bioluminescência observado foi maior

comparativamente ao 7º dia. Alguns fatores poderiam contribuir para expressão deste perfil de bioluminescência: a disponibilidade da luciferina para as células transplantadas e a sobrevivência das células após o transplante. Após a lesão em medula espinhal, os vasos sanguíneos são danificados no sítio da lesão. Os vasos sanguíneos ao redor do sítio da lesão são recuperados por angiogênese nas primeiras duas semanas.

Roet et al. (2012) sugeriam que a angiogênese facilita a captura da luciferina pelas células transplantadas. O 14º dia corresponde com a recuperação do fluxo sanguíneo na lesão e ao redor dela, aumentando a captura da luciferina pelas células transplantadas e consequentemente um sinal mais intenso. A importância da disponibilidade da luciferina também é demonstrada pela diferença entre o rápido e alto sinal de bioluminescência observado após a segunda injeção comparada com um sinal relativamente mais fraco da primeira injeção. No primeiro transplante (7º dia), possivelmente uma maior quantidade de citocinas inflamatórias estavam no local próximo à lesão e as CTDAh (Grupos B e C) permaneceram neste sítio inflamatório. Por não haver uma imunossupressão prévia ao transplante, as CTDAh atuaram mais eficientemente no local da lesão, suprimindo a resposta imune local. No segundo transplante (14º dia), possivelmente o ambiente inflamatório estava mais controlado, não havendo a necessidade de uma atuação mais intensa pelas CTDAh, como no primeiro transplante.

A diferença observada, embora não estatisticamente significativa, quando comparada as médias do sinal de bioluminescência, entre os grupos B e C no 14º dia pode ser explicada devido ao ambiente inflamatório e ao potencial de imunomodulação das CTDAh. Está bem descrito na literatura que a imunossupressão mediada pelas células-tronco mesenquimais requer a ativação

preliminar das células do sistema imune com a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , associadas ou não a TNF- α , IL-1 α ou IL-1 β (KRAMPERA, et al., 2006; REN et al., 2008). O corticoide nos animais do grupo C diminuiu a quantidade de células inflamatórias presentes na lesão. No momento do transplante, provavelmente a quantidade de citocinas inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , estavam em baixos níveis e as CTDAh transplantadas não se tornaram ativadas ou não permaneceram no local da lesão no primeiro transplante, já no segundo transplante não havia mais ação do corticoide.

No animal onde foi possível o monitoramento do sinal de bioluminescência no 7°, 14° e 30° dias após a lesão medular, observou-se uma grande redução na intensidade do sinal no 30° dia. Outros autores também relatam declínio no sinal luminescente após os primeiros dias pós-transplante e que uma pequena quantidade se integrou na medula espinhal (PEARSE et al., 2007; ROET et al., 2012).

Neste estudo os efeitos da terapia celular na recuperação da micção foram significativos, comprovando os resultados de Azari et al. (2010) e Silva (2012), no entanto Park et al., (2010) não obtiveram os mesmos resultados favoráveis.

O uso de células-tronco associado a massagens vesicais influenciaram a preservação das estruturas histológicas da bexiga urinária, pois em nenhum grupo foram percebidas alterações vesicais, resultados que corroboram os encontrados por Silva (2012). Garros et al. (2006) e Maia et al. (2006) concluíram em seus estudos que a alta colagenização sugere benefício no processo cicatricial. No presente estudo o nível de colagenização foi próximo entre os grupos, porém houve diferença do grupo controle para grupo célula-tronco associada à corticoterapia, o mecanismo exato para essas melhorias permanece indefinido.

O volume de células usado no transplante foi similar ao usado por All et al. (2012) de $1,2 \times 10^6$ céls/aplicação. Pal et al. (2010) analisaram os efeitos de 5×10^3 céls/aplicação e $1,25 \times 10^6$ céls/aplicação e concluíram que a maior dose proporcionou melhores resultados, porém, segundo estes mesmos autores, a recuperação poderá não ser um fenômeno dose dependente, talvez o fator de maior importância seja o maior número de células que sobrevivam no local após o transplante.

A via de aplicação das células foi a mesma de Takahashi et al. (2011) e All et al. (2012), a aplicação de células de forma descontinuada e a manutenção da agulha no espaço epidural após a injeção para evitar refluxo possivelmente contribuiu para os resultados de melhora de função, conforme verificado por Pal et al. (2010) e All et al. (2012).

A aplicação de células após sete dias seguiu modelo de Cho et al. (2009), Gu et al. (2010) e Oh et al. (2011). A aplicação das células após este período, seria para evitar uma reação inflamatória muito intensa logo após a lesão, o que poderia levar a perda de grande parte das CTDAh transplantadas, entretanto, Rodrigues (2011) observou em seus estudos que o transplante de células foi mais eficaz para a recuperação funcional de ratas Wistar com lesão medular quando realizado pela via de administração local 1h após a lesão, quando comparado com a administração na cisterna magna e aplicação nove dias após a lesão.

3.6 CONCLUSÃO

O uso de células-tronco derivadas do tecido adiposo associadas ou não à aplicação de succinato sódico de metilprednisolona contribui positivamente para a melhora clínica em ratos Wistar após lesão medular compressiva.

O estudo com bioluminescência *in vivo* possibilita o monitoramento da migração celular.

O transplante de células-tronco é efetivo na recuperação da continência urinária.

A associação das células-tronco mesenquimais ao corticoide não demonstrou ser um tratamento mais eficiente comparado ao transplante isolado de CTDAh.

3.7 REFERÊNCIAS

- ABRAMS, M.B.; DOMINGUEZ, C.; PERNOLD, K.; REGER, R.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; OLSON, L.; PROCKOP, D. Multipotent mesenchymal stromal cells attenuate chronic inflammation and injury-induced sensitivity to mechanical stimuli in experimental spinal cord injury. **Restorative Neurology and Neuroscience**. v. 27, n. 4, p. 307-321. 2009.
- ALL, A. H.; BAZLEY, F. A.; GUPTA, S.; PASHAI, N.; HU, C.; POURMORTEZA, A.; KERR, C. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitors Aid in Functional Recovery of Sensory Pathways following Contusive Spinal Cord Injury. **Plos One**, v. 7, n. 1, p. 1-11. 2012.
- ANKENY, D. P.; MCTIGUE, D. M.; JAKEMAN, L. B. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. **Experimental Neurology**. v. 190, p.17-31. 2004.
- ARAÚJO, M. R. Avaliação histológica e imunofluorescente da lesão compressiva na medula espinhal de ratos Wistar tratados com células-tronco mesenquimais. 2013. 45f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa.
- ARIAS, M. V. B.; SEVERO, M. S.; TUDURY, E. A. Trauma medular em cães e gatos: revisão da fisiopatologia e do tratamento médico. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 28, n. 1, p. 115-134. 2007.
- AZARI, M. F.; MATHIAS, L.; OZTURK, E.; CRAM, D. S.; BOYD, R. L.; PETRATOS, S. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of CNS Injury. **Current Neuropharmacology**. v. 8, p. 316-323. 2010.
- BAI, X.; PINKERNELL, K.; SONG, Y. H.; NABZDYK, C.; REISER, J.; ALT, E. Genetically selected stem cells from human adipose tissue express cardiac markers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 355, n. 3, p. 665-671. 2007.
- BAKSHI, A.; BARSHINGER, A.; SWANGER, S.; MADHVANI, V.; SHUMSKY, J.; NEUHUBER, B.; FISCHER I. Lumbar Puncture Delivery of Bone Marrow Stromal Cells in Spinal Cord Contusion: A Novel Method for Minimally Invasive Cell Transplantation. **Journal of Neurotrauma**. v. 23, p. 55-65. 2006.
- BARREIRA, A. P. B. Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunoistoquímica. 2005. 98f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **Journal of Neurotrauma**. v. 12, n. 1, p. 1-21. 1995.

BIERNASKIE, J.; SPARLING, J. S.; LIU, J.; SHANNON, C. P.; PLEMEL, J. R.; XIE, Y.; MILLER, F. D.; TETZLAFF, W. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. **The Journal of Neuroscience**. v. 27, p. 9545-9559. 2007.

BRAUND, K. G.; VITE, C. H. Traumatic disorders. In: **Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2003. Disponível em <http://www.ivis.org>. Acessado em 05 de abril de 2013.

BROOKE, G.; COOK, M.; BLAIR, C.; HAN, R.; HEAZLEWOOD, C.; JONES, B.; KAMBOURIS, M.; KOLLAR, K.; MCTAGGART, S.; PELEKANOS, R.; RICE, A.; ROSSETTI, T.; ATKINSON, K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v.18, n.1, p.846-858. 2007.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of Pathology**. v. 217, n. 2, p. 318-324. 2009.

CARVALHO, P. H. Avaliação neurológica e histológica de lesão compressiva da medula espinhal de ratos Wistar, tratados com células-tronco mesenquimais. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa.

CHO, S.; KIM, Y. R.; KANG, H.; YIM, S. H.; PARK, C.; MIN, Y. H. LEE, B. H.; SHIN, J. C.; LIM, J. Functional Recovery After the Transplantation of Neurally Differentiated Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow in a Rat Model of Spinal Cord Injury **Cell Transplantation**. v. 18, p. 1359-1368. 2009.

CHOPP, M.; ZHANG, X. H.; LI, Y.; WANG, L.; CHEN, J.; LU, D.; LU, M.; ROSENBLUM, M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. **Neuroreport**. v. 11, p. 3001-3005. 2000.

CRIGLER, L.; KAZHANIE, A.; YOON, T.J.; ZAKHARI, J.; ANDERS, J.; TAYLOR, B.; VIRADOR, V. M. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. **The FASEB Journal – The Journal of the American Societies for Experimental Biology**. v. 21, n. 9, p. 2050-2063. 2007.

DAI, W.; HALE, S. L.; MARTIN, B. J.; KUANG, J. Q.; DOW, J. S.; WOLD, L. E.; KLONER, R. A. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short and long-term effects. **Circulation**. v. 112, n. 2, p. 214-223. 2005.

DAI, L. J.; LI, H. Y.; GUAN, L. X.; RITCHIE, G.; ZHOU, J. X. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. **Stem Cell Research**. v.2, n.1, p.16-25. 2009.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; FIGUEIREDO, L. F. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 56, n. 1, p. 103-111. 2010.

DE UGARTE, D. A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO Z.; ZUK, P. A.; ZHU, M.; DRAGOO, J. L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M. H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**. v. 174, n. 3, p. 101-109. 2003.

DENIS, J. E.; CAPLAN, A. I. Bone marrow mesenchymal stem cells. In: SELL, S. **Stem cells handbook**. Human Press, 2004. cap.10, p.107-118.

DJOUAD, F.; BOUFFI, C.; GHANNAM, S.; NOEL, D.; JORGENSEN, C. Mesenchymal stem cells: innovate therapeutic tools for reumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology* v.5, p. 392-399. 2009.

DOMINICI M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE D.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**. v. 8, n.4, p. 315-317. 2006.

FERRARI, G.; CUSELLA, G.; DE ANGELIS, M. C.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**. v. 279, n.5.536, p.1528-1530, 1998.

FITZMAURICE, S. N. Fratura da Coluna Vertebral. In: **Neurologia em Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, Cap. 42. p. 181-183.

FORNER S. Envolvimento dos receptores b1 e b2 para as cininas na hiperatividade da bexiga urinária induzida por lesão medular em ratos. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina.

FRASER, J. K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n. 4, p. 150-154. 2006.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monlayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**. v. 3, n.4, p. 393-403. 1970.

GARROS, I. C.; CAMPOS, A. C. L.; TÂMBARA, E. M.; TENÓRIO, S. B.; TORRES, O. J. M.; AGULHAM, M. A.; ARAÚJO, A. C. F.; SANTIS-ISOLAN, P. M. B.; OLIVEIRA, R. M.; ARRUDA, E. C. M. Extrato de *passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, n. 3, p. 55-65. 2006.

GEBLER, A.; ZABEL, O.; SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends in Molecular Medicine**. v. 18, n. 2, p. 128-134. 2012.

GEFFNER, L. F.; SANTACRUZ, P.; IZURIETA, M.; FLOR, L.; MALDONADO, B.; AUAD, A. H.; MONTENEGRO, X.; GONZALEZ, R.; SILVA, F. Administration of autologous bone marrow stem cells into spinal cord injury patients via multiple routes

is safe and improves their quality of life: comprehensive case studies. **Cell Transplantation**. v. 17, p. 1277-1293. 2008.

GHANNAM, S.; BOUFFI, C.; DJOUAD, F.; JORGENSEN, C.; NOEL, D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. **Stem Cell Research Therapy**. v.1, n.2, p. 1-7. 2010.

GRECO, S. J.; ZHOU, C.; YE, J. H.; RAMESHWAR, P. A method to generate human mesenchymal stem cell-derived neurons which express and are excited by multiple neurotransmitters. **Biological Procedures Online**. v. 10, p. 90-101. 2008.

GREEN, J.; BOSCO, E. Trauma de medula espinhal. In: TELLO, L. H. – **Trauma em Cães e Gatos**. São Paulo: MedVet Livros, 2008. Cap. 14, p. 165 – 176.

GU, W.; ZHANG, F.; XUE, Q.; MA, Z.; LU, P.; YU, B. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduces lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord. **Neuropathology**. v. 30, p. 205-217. 2010.

GUEST, J. D.; HERRERA, L.; MARGITICH, I.; OLIVERIA, M.; MARCILLO, A.; CASAS, C. E. Xenografts of expanded primate olfactory ensheathing glia support transient behavioral recovery that is independent of serotonergic or corticospinal axonal regeneration in nude rats following spinal cord transection. **Experimental Neurology**. v. 212, n. 2, p. 261–274. 2008.

HERRERO, M. D.; GARCIA-ARRANZ, M.; GUADALAJARA, H.; DE-LA-QUINTANA, P.; GRACIA-OLMO, D. Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1: fistula Advanced Therapy Trial 1) and long-term evaluation. **Diseases of the Colon & Rectum**. v. 55, n. 7, p. 762-772. 2012.

HOFSTETTER, C.P.; SCHWARZ, E. J.; HESS, D.; WIDENFALK, J.; EL MANIRA, A.; PROCKOP, D. J.; OLSON, L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, n. 4, p. 2191-2944. 2002.

HU, J.; ZHU, Q. T.; LIU, X. L.; XU, Y. B.; ZHU, J. K. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. **Experimental Neurology**. v.204, p.658–666. 2007.

JIANG, W.; MA, A.; WANG, T.; HAN, K.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; ZHAO, X.; DONG, A.; DU, Y.; HUANG, X.; WANG, J.; LEI, X.; ZHENG, X. Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. **Transplant International**. v. 19, n. 7, p. 570-580. 2006.

KAMINSKI, E.. L. Transplante de células mononucleares da medula óssea em um modelo experimental de lesão da medula espinhal. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KIM, Y.; KIM, H.; CHO, H.; BAE, Y.; SUH, K.; JUNG, J. S. Direct Comparison of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissues and Bone Marrow in Mediating Neovascularization in Response to Vascular Ischemia. **Cellular Physiology Biochemistry**. v.20, n. 6, p. 867-876. 2007.

KIM, H.; WALCZAK, P.; MUJA, N.; CAMPANELLI, J. T.; BULTE, J. W. M. ICV-Transplanted human glial precursor cells are short-lived yet exert immunomodulatory effects in mice with EAE. **Glia**. v. 60, n. 7, p. 117-1129. 2012.

KOERNER, J.; NESIC, D.; ROMERO, J. D.; BREHM, W.; MAINILVARLET, P.; GROGAN, S. P. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**. v.24, n.4, p.1613–1619. 2006.

KOLOSSOV, E.; LU, Z.; DROBINSKAYA, I.; GASSANOV, N.; DUAN, Y.; SAUER, H.; MANZKE, O.; BLOCH, W.; BOHLEN, H.; HESCHELER, J.; FLEISCHMANN, B. K. Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. **The FASEB Journal – The Journal of the American Societies for Experimental Biology**. v. 19, n. 6, p. 577-579. 2005.

KRAMPERA, M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G.; FRANCHINI, M.. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone** v. 39, p. 678–683. 2006.

KRAUSE, D. S; THEISE, N.D.; COLLECTOR, M. I; HENEGARIU, O.; HWANG, S.; GARDNER, R.; NEUTZEL, S.; SHARKIS, S. J. Multiorgan, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cel**. v. 105 n. 3, p. 369-377. 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. Tissue renewal and repair: regeneration, realing and fibrosis. In: KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran. Pathologic basis of disease**. 7ed. Philadelphia: Elsevier Sauders, 2005. Cap.3, p 91-94.

KUROZUMI, K.; NAKAMURA, K.; TAMIYA, T.; KAWANO, Y.; KOBUNE, M.; HIRAI, S.; UCHIDA, H.; SASAKI, K.; ITO, Y.; KATO, K.; HONMOU, O.; HOUKIN, K.; DATE, I.; HAMADA H. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. **Molecular Therapy**. v. 9, n. 5, p. 189-197. 2004.

LEAL FILHO, M. B.; MORANDIN, R. C.; ALMEIDA, A. R., CAMBIUCCI, E. C.; METZE, K.; BORGES, G.; GONTIJO, J. A. R. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury - An experimental model. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. n.63, v.4, p.990-996. 2005.

LEE, R. H.; KIM, B. C.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, H. S.; SUH, K. T.; BAE, Y. C.; JUNG, J. S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cellular Physiology Biochemistry**. v. 14, n.4-6, p.311-324. 2004.

LIANZA, S.; CASALIS, M. E.; GREVE, J. M. D.; EICHBERG, R. A lesão medular. In: **Medicina de Reabilitação**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2001. p. 299-322.

LU, P.; JONES, L. L.; TUSZYNSKI, M. H. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal Cord injury. **Experimental Neurobiology**. v. 191, n. 2, p.344-360. 2005.

LUO, J.; HO, P.; STEINMAN, L.; WYSS-CORAY, t. Bioluminescence in vivo imaging of autoimmune encephalomyelitis predicts disease. **Journal of Neuroinflammation** v. 5, n.6, p. 1-6. 2008.

MAIA, J. M. A.; CZECZKO, N. G.; RIBAS FILHO, J. M.; DIETZ, U. A.; DUCK, D.; RIBAS, C. A. P. M.; SANTOS, E. A.; BAPTISTELLA, E.; WALLBACH, T. Z.; VALE, J. R.; YAGUSHITA, N. Estudo da cicatrização de suturas na bexiga urinária de ratos com e sem a utilização de extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. intraperitoneal. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, n.2, p. 23-30. 2006.

MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; MITCHELL, J. B.; FLOYDE, Z. E.; HAMMILL, L.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; TING, J. P.; STORMS, R. W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J. M. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. **Stem Cells – Tissue Specific Stem Cells**. v.24, n.6, p.1246-1253. 2006.

MEIRELLES, L. C.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. v.119, n.11, p.2204-2213. 2006.

MEIRELLES, L. S.; FONTES, A. M.; COVAS, D. T.; CAPLAN, A. L. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 20. P. 419-427. 2009.

MERT, T.; GUNES, Y.; OZCENGIZ, D. Modification of local anesthetic-induced antinociception by fentanyl in rats. **Pharmacological reports**. v. 63, p. 1427-1434. 2011.

MEYER, F.; VIALLE, L. R.; VIALLE, E. N.; BLEGGI-TORRES, L. F.; RASERA, E.; LEONEL, I. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, n. 3, p. 203-208. 2003.

MEZEY, E.; CHANDROSS, K. J.; HARTA, G.; MAKI, R. A.; MCKERCHER, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**. v. 290, n. 5497, p. 1779-1782. 2000.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.;ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**. v.30, n.3, p.681-687. 2006.

MINGUELL, J. J.; CONGET, P. ERICES, A. Biology and Clinical Utilization of Mesenchymal Progenitor Cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, n. 8 p. 881-887. 2000.

MUSINA, R. A.; BEKCHANOVA, E. S.; SUKHIKH, G. T. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v. 139, n. 4, p. 504-509. 2005.

NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook Experimental Pharmacology**, New York, v.174, n. 6, p.249–282. 2006.

NIE, X.; ZHANG, Y. J.; TIAN, W. D.; JIANG, M.; DONG, R.; CHEN, J. W.; JIN, Y. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**. v.36, n.1, p. 32–38. 2007.

NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J.L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**. v.69, p.928–937. 2008.

NÖTH, U.; OSYCZKA, A. M.; TULI, R.; HICKOK, N. J.; DANIELSON, K. G.; TUAN, R. S. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 20, n. 5, p. 1060-1069. 2002.

OGAWA D.; OKADA, Y.; NAKAMURA, M.; KANEMURA, Y.; OKANO, H. J.; MATSUZAKO, Y.; SHIMAZAKI, T.; ITO, M.; IKEDA, E.; TAMIYA, T.; NAGAO, S.; OKANO, H. Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: Properties and tumorigenicity after long term in vitro maintenance. **Journal of Neuroscience Research**. v 87, n.2, p. 307-317. 2009.

OH, J. S.; KIM, K. M.; AN, S. S.; PENNANT, W. A.; KIM, H. J.; GWAK, S.; YOON, D. H.; LIM, M. H.; CHOI, B. H.; HA, T Co-transplantation of Mouse Neural Stem Sells (mNSCs) with Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Sells Improves mNSC Survival in a Rat Spinal Cord Injury Model. **Cell Transplantation**. v. 20, n. 6, p. 837-849. 2011.

OKADA, S.; ISHII, K.; YAMANE, J.; IWANAMI, A.; IKEGAMI, T.; KATOH, H.; IWAMOTO, Y.; NAKAMURA, M.; MIYOSHI, H.; OKANO, H. J.; CONTAG, C. H.; TOYAMA, Y.; OKANO, H. In vivo imaging of engrafted neural stem cells: Its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. **The FASEB Journal**. v. 19, p.1839-1841. 2005.

OSAKA, M.; HONMOU, O.; MURAKAMI, T.; NONAKA, T.; HOUKIN, K.; HAMADA, H.; KOCSIS, J. D. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. **Brain Research**. v. 1343, p. 226–235. 2010.

OSAKO, F. S. U.; AKAMINE, C.; SANTOS, M. M. Emergências Neurológicas. In: SANTOS, M. M. e FRAGATA, F. S. **Emergências e Terapia Intensiva Veterinária em Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 23, p. 317 – 329.

PAL, R.; GOPINATH, C.; RAO, N.; BANERJEE, P.; KRISHNAMOORTHY, V.; VENKATARAMANA, N. K.; TOTEY, S. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. **Cytotherapy**. v. 12, n. 6, p. 792-806. 2010

PARK, W. B.; KIM, S. Y.; LEE, S. H.; KIM, H.; PARK, J.; HYUN, J. K. The effect of mesenchymal stem cell transplantation on the recovery of bladder and hindlimb function after spinal cord contusion in rats. **BioMed Central Neuroscience**. v. 11, p. 119-130. 2010.

PARK, E. H.; WHITE, G. A.; TIEBER, L.M. Mechanisms of injury and emergency care of acute spinal cord injury in dogs and cats. **Journal Veterinary Emergency and Critical Care**. v. 22, n. 2, p. 160-178. 2012.

PARR, A. M.; KULBATSKI, I.; ZAHIR, T.; WANG, X.; YUE, C.; KEATING, A.; TATOR C. H. Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. **Neuroscience**. v. 155, p. 760–770. 2008.

PAULA, S; PEDROSO, M. F.; DALBEM, A.; COSTA, Z. S. M.; VITOLA, A.; BAES, C. V. W.; SILVA, J. L. B.; FRIEDRICH, M. A. G.; COSTA, J. C. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 263-269. 2005.

PEARSE, D. D.; SANCHEZ, A. R.; PEREIRA, F. C.; ANDRADE, C. M.; PUZIS, R.; PRESSMAN, Y.; GOLDEN, K.; KITAY, B. M.; BLITS, B.; WOOD, P. M.; BUNGE, M. B. Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. **Glia**. v. 55, p. 976–1000. 2007.

PELLEGRINO, F.; SURANITI, A.; GARIBALDI, L. **Síndromes Neurológicas em Cães e Gatos – Avaliação clínica, Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Interbook, 2003, p. 129-139.

PEREIRA L. V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 13, p. 7-14. 2008.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**. v. 95, n. 1, p. 9-20. 2004.

PLOTNIKOV, A. N.; SHLAPAKOVA, I.; SZABOLCS, M. J.; DANILO JR, P.; LORELL, B. H.; POTAPOVA, I. A.; LU, Z.; ROSEN, A. B.; MATHIAS, R. T.; BRINK, P. B.; ROBINSON, R. B.; COHEN, I. S.; ROSEN, M. R. Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart. **Circulation**. v. 116, n. 7, p. 706-13. 2007.

POLL, D.; PAREKKADAN, B.; BOREL, R. I. H. M.; TILLES, A. W.; YARMUSH, M. L. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs. **Cellular and Molecular Bioengineering**. v. 1, p. 42–50. 2008.

PUISSANT, B.; BARREAU, C.; BOURIN, P.; CLAVEL, C.; CORRE, J.; BOUSQUET, C.; TAUREAU, C.; COUSIN, B.; ABBAL, M.; LAHARRAGUE, P.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L.; BLANCHER, A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**. v.129, n.1, p.118–129. 2005.

QUERTAINMONT, R.; CANTINIEAUX, D.; BOTMAN, O.; SID, S.; SCHOENEN, J.; FRANZEN, R. Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Rats through Neurotrophic and Pro-Angiogenic Actions. **Plos One**. v. 7, n. 6, p. 1-15. 2012.

RA, J. C.; SHIN, I. S.; KIM, S. H.; KANG, S. K.; KANG, B. C.; LEE, H. Y.; KIM, Y. J.; JO, J. Y.; YOON, E. J.; CHOI, H. J.; KWON, E. Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Humans. **Stem Cells and Development**. v. 20, p. 1297-1308. 2011.

RABCHEVSKY, A. G.; FUGACCIA, I.; SULLIVAN, P. G.; BLADES, D. A.; SCHEFF, S. W. Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. **Journal Neuroscience Research**. v. 68, n. 1, p.7-18. 2002.

REBELATTO, C.K.; AGUIAR, A. M.; MORETÃO, M. P.; SENEGAGLIA, A.C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V. F.; BROFMAN, P. S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L. S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**. v. 233, n. 7, p. 901-913. 2008.

REN, H.; YIN, P.; DUAN, C. IGFBP-5 regulates muscle cell differentiation by binding to IGF-II and switching on the IGF-II auto-regulation loop. **The Journal of Cell Biology**. v. 182, n. 5, p. 979-991. 2008.

RODRIGUES, L. P. O uso de células-tronco adultas humanas na recuperação funcional da lesão medular traumática em ratos Wistar. 2011.104f. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROET, K. C. D.; EGGERS, R.; VERHAAGEN, J. Noninvasive bioluminescence imaging of olfactory ensheathing glia and schwann cells following transplantation into the lesioned rat spinal cord. **Cell Transplantation**. v. 21, p. 1853-1865. 2012

RONAGHI, M.; ERCEG, S.; MORENO-MANZANO, V.; STOJKOVIC M. Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? **Stem Cells**. v. 28, p. 93-99. 2010.

ROSSI, S. L.; NISTOR, G.; WYATT, T.; YIN, H. Z.; POOLE, A. J.; WEISS, J. H.; GARDNER, M. J.; DIJKSTRA, S.; FISCHER, D. F.; KEIRSTEAD, H. S. Histological and Functional Benefit Following Transplantation of Motor Neuron Progenitors to the Injured Rat Spinal Cord. **Plos One**. v. 5, p. 1-15. 2010.

SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M.; VILLEROCHÉ, V. J.; ROSSI, G. A.; BROUTY-BOYÉ D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**. v. 85, n. 8, p. 962-971. 2005.

SABERI, H.; MOSHAYEDI, P.; AGHAYAN, H. R.; ARJMAND, B.; HOSSEINI, S. K.; EMAMI-RAZAVI, S. H.; RAHIMI-MOVAGHAR, V.; RAZA, M.; FIROUZI, M. Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: An interim report on safety considerations and possible outcomes. **Neuroscience Letters**. v. 443, p. 46–50. 2008.

SAHNI, V.; KESSLER, J. A. Stem cell therapies for spinal cord injury. **Nature Reviews Neurology**. n. 6, p. 363-372. 2010.

Schultz, S. S. Adult stem cell application in spinal cord injury. **Current Drugs Targets**. v. 6, p. 63–73. 2005.

ŠEDÝ, J.; ZICHA, J.; KUNEŠ, J.; JENDELOVÁ, P.; SYKOVÁ, E. Rapid but not Slow Spinal Cord Compression Elicits Neurogenic Pulmonary Edema in the Rat. **Physiological Research**. v.58, p. 269-277. 2009.

SELMANI, Z.; NAJI, A.; ZIDI, I.; FAVIER, B.; GAIFFE, E.; OBERT, L.; BORG, C.; SAAS, P.; TIBERGHIE, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. D.; DESCHASEAUX, F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells*. v. 26, n. 1, p. 212-22. 2008.

SHARP, N. J. H; WHEELER, S. J. Trauma. In: **Small animal spinal disorders: Diagnosis and Surgery**. 2ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005, Cap. 13. p. 281-318.

SHI, S.; BARTOLD, P. M.; MIURA, M.; SEO, B. M.; ROBEY, P. G.; GRONTHOS, S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthodontics & Craniofacial Research**. v. 8, n. 3, p. 191-199. 2005.

SHI, Y.; HU, G.; SU, J.; LI, W.; CHEN, Q.; SHOU, P.; XU, C.; CHEN, X.; HUANG, Y.; ZHU, Z.; HUANG, X.; HAN, X.; XIE, N.; REN, G. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. **Cell Research**. v. 20, n. 5, p. 510-518. 2010.

SILVA, A. J. Avaliação da aplicação intravenosa de células-tronco mesenquimais em ratos Wistar submetidos à lesão raquimedular. 2012. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais.

SOUZA, A. S.; ESCOBAR, F. B.; DEL BEL, E. A. Influência do estreitamento do canal vertebral e do tempo para a descompressão na recuperação locomotora de ratos. **Coluna/Columna**. v. 8, n.2, p.117-126. 2009.

STRUTT, B.; KHALIL, W.; KILLINGER, D.; Growth and differentiation of human adipose stromal cells in culture. In: **Methods in Molecular Medicine: Human Cell Culture Protocols**. New Jersey: Humana Press, p 41-51, 1996.

TAKAHASHI, Y.; TSUJI, O.; KUMAGAI, G.; HARA, C. M.; OKANO, H. J.; MIYAWAKI, A.; TOYAMA, Y.; OKANO, H.; NAKAMURA, M. Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. **Cell Transplantation**. v. 20, p.727-739. 2011.

TARASENKO, YI.; GAO, J.; NIE, L.; JOHNSON, K. M.; GRADY, J. J.; HULSEBOSCH, C. E.; MCADOO, D. J.; WU P. Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior. **Journal of Neuroscience Research**. v. 85, p. 47–57. 2007.

TEBET, M. A.; BARROS FILHO, T. E. P.; MACHADO, I. R.; CARVALHO, M. O. P.; HANANIA, F. R.; DACI, K. Efeito da metilprednisolona na lesão medular em ratos: análise funcional e histológica. **Acta Ortopédica Brasileira**. v. 11, n. 2 , p. 80-87. 2003.

THURET, S.; MOON, L. D.; GAGE, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nature Review Neuroscience**. v. 7, p. 628-643. 2006.

TOBIAS, C. A.; SHUMSKY, J. S.; SHIBATA, M.; TUSZYNSKI, M. H.; FISCHER, I.; TESSLER, A.; MURRAY, M. Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration. **Experimental Neurology**. v. 184, p. 97–113. 2003.

TOOMBS, J. P.; WATERS, D. J. Afecção do Disco Intervertebral. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007. v.1, cap.80, p.1193 - 1209.

TSUJI O.; MIURA, K.; FUJIYOSHI, K.; MOMOSHIMA, S.; NAKAMURA M.; OKANO, H. Cell Therapy for Spinal Cord Injury by Neural Stem/Progenitor Cells Derived from iPS/ES Cells. **Neurotherapeutics**. v. 8, p. 668-676. 2011.

UCCELLI A, BENVENUTO F, LARONI A, GIUNTI D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. **Best Practice & Research Clinical Haematology**. v. 24, p. 59–64. 2011.

URDZIKOVA, L.; JENDELOVA, P.; GLOGAROVA, K.; BURIAN, M.; HAJEK, M.; SYKOVA, E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. **Journal of Neurotrauma**. v.23, n. 9, p. 1379-1391. 2006.

VIALLE, E. N.; VIALLE, L. R. G.; BLEGGI-TORRES, L. F., SAKAMOTO, K. S. Avaliação histológica do efeito da metilprednisolona sobre a lesão medular experimental em ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 42, n. 4, p. 101-113. 2007.

WEBB, A. A.; NGAN, S.; FOWLER, J. D. Spinal cord injury I: A synopsis of the basic science. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 51, p. 485-492. 2010.

WONG, T.; GAMMON, L.; LIU, L.; MELLERIO, J. E.; DOPPING-HEPENSTAL, P. J. C.; PACY, J.; ELIA, G.; JEFFERY, R.; LEIGH, I. M.; NAVSARIA, H.; MCGRATH, J. A. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 128, p. 2179–2189. 2008.

WU, S.; SUZUKI, Y.; EJIRI, Y.; NODA, T.; BAI, H.; KITADA, M.; KATAOKA, K.; OHTA, M.; CHOU, H.; IDE, C. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. **Journal of Neuroscience Research**, v. 72, p. 343–351. 2003.

XU H.; MIKI, K.; ISHIBASHI, S.; INOUE, J.; SUN, L.; ENDO, S.; SEKIYA, I.; MUNETA, T.; INAZAWA, J.; DEZAWA, M.; MIZUSAWA, H. Transplantation of neuronal cells induced from human mesenchymal stem cells improves neurological functions after stroke without cell fusion. **Journal of Neuroscience Research**. v. 88, p. 3598–3609. 2010.

YOSHIHARA H, SHUMSKY JS, NEUHUBER B, OTSUKA T, FISCHER I, AND MURRAY M. Combining motor training with transplantation of rat bone marrow stromal cells does not improve repair or recovery in rats with thoracic contusion injuries. **Brain Research**. 1119, 65–75. 2006.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: SEMINÁRIO DO INSTITUTO FERNANDO HENRIQUE CARDOSO, 2004, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004, 23 p.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, H. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**. v.13, n.2, p.4279-4295. 2002.



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

ANEXO A

Curitiba, 12 de maio de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 601 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Corticoterapia e uso de células-tronco em ratos submetidos à lesão requimedular

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Ademar Villanova Júnior

EQUIPE DE PESQUISA:

José Ademar Villanova Júnior, Rosângela Locatelli Dittrich, Paulo Roberto Slud Brofman, Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto, Alexandra Cristina Senegaglia e Letícia Fracaro

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCAA / Doutorado

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos Wistar	Machos	20 semanas 250-270 g	C	72

O colegiado do CEUA em reunião no dia 12/05/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Obs.: Alterar para categoria "D".

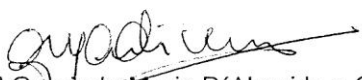
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser

mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,



Profª Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Associação Paranaense de Cultura - PUCPR

PROJETO DE PESQUISA

ANEXO B

Título: CORTICOTERAPIA E USO DE CÉLULAS-TRONCO EM RATOS SUBMETIDOS À LESÃO RAQUIMEDULAR

Área Temática:

Pesquisador: José Ademar Villanova Junior

Versão: 1

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

CAAE: 04257912.6.0000.0020

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 67978

Data da Relatoria: 01/08/2012

Apresentação do Projeto:

Será coletado tecido adiposo (gordura) excedente de sete pacientes submetidos a cirurgia bariátrica e dermolipectomia. Este tecido será utilizado em 63 ratos com trauma medular que serão divididos em três grupos.

Os ratos serão divididos em:

Grupo I - 21 ratos submetidos a trauma medular e a dois transplantes de placebo, um com sete dias pós-trauma e outro 14 dias pós-trauma (grupo controle negativo).

Grupo II: 21 animais submetidos a trauma medular e a dois transplantes nos mesmos períodos pós-trauma, com CTM de tecido adiposo humano.

Grupo III - 21 animais submetidos a trauma medular e a duas aplicações de succinato sódico de metilprednisolona, uma 5 minutos após o trauma medular e outra após 3 horas.

A hipótese é que o transplante das células-tronco derivadas de tecido adiposo pode ocasionar uma melhora clínica.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos deste estudo são avaliar a capacidade de regeneração das lesões medulares em ratos submetidos à terapia celular com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano e a interferência da corticoterapia no tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para os seres humanos não existe risco, pois o material coletado será extraído na própria cirurgia bariátrica e dermolipectomia, material este que seria descartado no procedimento cirúrgico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem um orçamento de R\$ 180.000,00 e conta com financiamento de agência de fomento tanto em custeio como capital.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está claro e adequado, descrevendo de uma forma simples e acessível ao sujeito de pesquisa, facilitando sua compreensão dos procedimentos de pesquisa.

Recomendações:

sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**ANEXO B (contin.)**

O projeto tem seu mérito, com financiamento externo. A participação dos sujeitos de pesquisa restringe doação de material que seria descartado na cirurgia. O estudo além de seu avaliado pelo comitê de ética pesquisa (CEP) deve ser submetido ao comitê de ética no uso de animais (CEUA).

No projeto o pesquisador define que o material coletado é de uso exclusivo nesta pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

sem considerações

CURITIBA, 06 de Agosto de 2012

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO

ANEXO C

Avaliação Funcional Escala Basso, Beatie and Bresnahan (B.B.B.)

A escala BBB observa os movimentos da articulação do quadril, joelho, tornozelo, posição do tronco, cauda e dígitos do membro pélvico. A partir destas observações, foram atribuídos pontos de zero a 21, sendo zero o correspondente à ausência total de movimentos e 21 à presença de movimentos normais.

- 0 - Nenhum movimento observável do membro pélvico.
- 1 - Movimento discreto (limitado) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou do joelho.
- 2 - Movimento extenso de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreta de uma outra.
- 3 - Movimento extenso de duas articulações.
- 4 - Movimento discreto de todas as três articulações do membro pélvico.
- 5 - Movimento discreto de duas articulações e movimento extenso da terceira.
- 6 - Movimento extenso de duas articulações e movimento discreto da terceira.
- 7 - Movimento extenso das três articulações do membro pélvico.
- 8 - Pedalada sem suporte de peso ou apoio plantar dos dígitos sem suporte de peso.
- 9 - Apoio plantar dos dígitos com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional, frequente ou consistente com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
- 10 - Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros torácico e pélvico.
- 11 - Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e nenhuma coordenação dos membros torácico e pélvico.
- 12 - Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação ocasional dos membros torácico e pélvico.
- 13 - Passo plantar com suporte de peso frequente à consistente e coordenação frequente dos membros torácico e pélvico.
- 14 - Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros torácico e pélvico e posição predominante dos dígitos rodados (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície (piso) bem como, antes de liberar os dígitos no final da fase de apoio ou passada plantar frequente, coordenação consistente dos membros torácico e pélvico e passada dorsal ocasional.
- 15 - Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros torácico e pélvico e nenhuma liberação dos dígitos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante dos dígitos paralelos ao corpo no instante do contato inicial.

ANEXO C (contin.)

16 - Passada plantar consistente e coordenação dos membros torácico e pélvico durante a marcha e a liberação dos dígitos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante dos dígitos é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.

17 - Passada plantar consistente e coordenação dos membros torácico e pélvico durante a marcha e a liberação dos dígitos ocorre frequentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante dos dígitos é paralela ao corpo nos instantes do contato inicial e da liberação dos dígitos.

18 - Passada plantar consistente e coordenação dos membros torácico e pélvico durante a marcha e a liberação dos dígitos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente, a posição predominante dos dígitos é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dígitos.

19 - Passada plantar consistente e coordenação dos membros torácico e pélvico durante a marcha e a liberação dos dígitos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante dos dígitos é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dígitos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.

20 - Passada plantar consistente e coordenação dos membros torácico e pélvico durante a marcha e a liberação dos dígitos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para frente; a posição predominante dos dígitos é paralela ao corpo nos instantes do contato e da liberação dos dígitos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.

21 - Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dígitos, a posição predominante dos dígitos é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, cauda consistentemente elevada.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **Journal of Neurotrauma**. v. 12, n. 1, p. 1-21. 1995.



Relação de Projetos no Convênio

Intituição: UFPR Universidade Federal do Paraná
Editais: 5 - 1 PROGRAMA UNIVERSAL - PESQUISA BÁSICA E APLICADA
Convênio : 404 / 2012

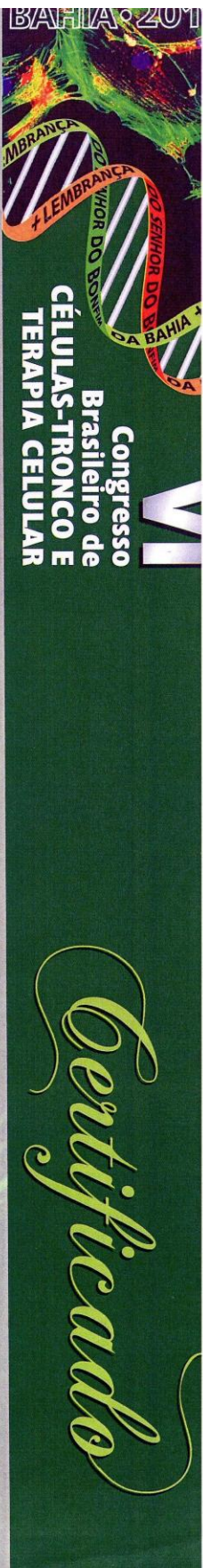
Projeto	Coordenador	Título	Valor
16.611	Rosangela Locatelli Dittrich	Corticoterapia e uso de células-tronco em ratos submetidos à lesão raquimedular	R\$24.431,00

Total do Convênio: R\$24.431,00

Existe dotação orçamentária e financeira para liberação do recurso deste Projeto, do orçamento de 2011.

José Carlos Gehr

Diretor de Adm. E Finanças



Certificamos que

**JOSÉ ADEMAR VILLANOVA JUNIOR;LETÍCIA FRACARO;CORINNE DE ALCÂNTARA
FERNANDES NASCIMENTO;CARMEN LÚCIA KUNUYOSHI REBELATO;ROSANGELA
LOCATELLI DITTRICH;PAULO ROBERTO SLUD BROFMAN**

apresentaram, no VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular realizado
no período de 28 de setembro a 01 de outubro de 2011, em Salvador - Bahia,
trabalho intitulado "STANDARDIZATION AND HISTOLOGICAL EVALUATION OF AN
EXPERIMENTAL MODEL OF SPINAL CORD INJURY", sob a forma de Poster.

196

Salvador, 01 de outubro de 2011

Ricardo Ribeiro dos Santos
Ricardo Ribeiro dos Santos

Presidente do VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular

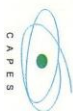
Rosalina Mendez-Otero
Rosalina Mendez-Otero
Presidente da ABTCEL



PROMOÇÃO / REALIZAÇÃO:



APOIO:



STANDARDIZATION AND HISTOLOGICAL EVALUATION OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF SPINAL CORD INJURY

José Ademair Villanova Junior^(1,2), Letícia Fracaro⁽²⁾, Corinne De Alcântara Fernandes Nascimento⁽³⁾, Carmen Lúcia Kunyoshi Rebelatto⁽²⁾, Paula Hansen Susst⁽¹⁾, Paulo Roberto Stud Brofman⁽²⁾, Rosângela Locatelli Dittrich⁽¹⁾

(1) Universidade Federal do Paraná
(2) Núcleo de Tecnologia Celular - Pontifícia Universidade Católica do Paraná
(3) Hospital Veterinário - Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Contact: letfraco@pucparana.com

INTRODUCTION

The spinal cord injury (SCI) is disabling and irreversible. Moreover, it has high social and economic costs. It results in local and distant damages to the cord followed by a range of cellular disturbances, hemostatic imbalance and ionic and neurotransmitter derangements. This is associated with degeneration of the spinal tracts and axons, loss of neurons and glia, demyelination in the vicinity of the lesion epicenter. In addition to this, there is a release of free radicals that leads to inflammation. These collectively lead to loss to functionally, resulting in paraplegia or quadriplegia. There are numerous experimental studies testing new techniques to produce a nerve injury in animal models. An experimental model of spinal cord injury should be well standardized and reproducible to serve as an important tool for studying new therapies. The aim of this study was to standardize a model of spinal cord injury that produces paraplegia for future investigations with cell therapy. The medullary lesions were caused by compression using a catheter inflated with saline solution and the effectiveness of the lesion was assessed histologically.

METHODS

The study was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research of Pontifícia Universidade Católica do Paraná (number 601). Male Wistar rats with body weight between 300-350 g were anesthetized and submitted to SCI. It was performed by insertion of catheter Fogarty No. 3 into the dorsal epidural space. The cuff of the catheter was inflated using 50 µL and 80 µL of saline solution (Fig. 1, A). After inflation to the final volume, the balloon was left in place for 5 min in all cases. Subsequently, the balloon was deflated and removed. The thoracolumbar region was compressed in T8 - T9 spinal level (Fig. 1, B). There were three groups: group A (n=2), animals without SCI, control group; group B (n=18), animals submitted to SCI using 50 µL of saline; group C (n=25), animals submitted to SCI using 80 µL of saline. Motor evaluation was performed on animals using BBB locomotor score. After the seventh day of injury, the animals were euthanized and the spinal cord was removed. All spinal cords were placed in paraformaldehyde and submitted for histopathologic examination (Fig. 1, C). Specimens were sectioned and processed with paraffin. The slides were stained with hematoxylin-eosin (H&E).



Fig. 1. (A) Catheter Fogarty No. 3. On the bottom right corner of the photograph is shown the cuff of the catheter inflated with saline solution. (B) Spinal cord injury in T8 - T9 spinal level. (C) Spinal cord fixed with paraformaldehyde.

RESULTS

No animals had spinal cord laceration or other evidence of injury below the level of balloon inflation that would suggest injury from the catheterization. Mortality varied among groups, with 0% (n=0) in group A, 27.8% (n=5) in group B and 48% (n=12) in group C. The cause of death was neurogenic pulmonary edema. Regarding the recovery of movement, group A showed 100% (n=2) of normal walking, group B showed 30.8% (n=4) of normal walking, 30.8% (n=4) of paraplegia, 30.8% (n=4) of paraparesis and 7.6% (n=1) of monoparesis while paraplegia was observed in 100% (n=13) of the survivors of group C. This evaluation corresponds to a BBB locomotor score at 7 days post-injury. After histopathologic evaluation (Fig. 2), in the animals submitted to SCI using 50 µL of saline, only loss of motor neurons was detected (Fig. 2, B). In contrast, it was observed hemorrhage, necrosis, loss of motor neurons and histologic abnormalities in all animals when used 80 µL of saline solution (Fig. 2, C and D).

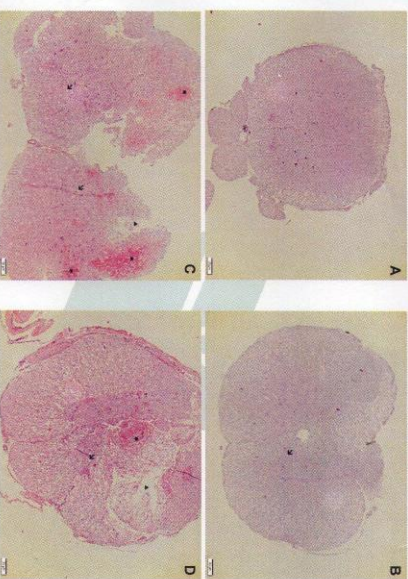


Fig. 2. Histopathological analysis. (A) Normal spinal cord, control group. (B) Medullary lesion caused by compression using a catheter inflated with 50 µL of saline solution. Loss of motor neurons was observed. (C and D) SCI caused by compression using a catheter inflated with 80 µL of saline solution. It was observed hemorrhage, necrosis, loss of motor neurons and histologic abnormalities. Hemorrhage (A), Necrosis (A), Loss of motor neurons (A).

CONCLUSION

Even though the procedure using 80 µL of saline to inflate the cuff showed the highest mortality, it was the most efficient injury wise since it showed 100% of paraplegia. Histological evaluation showed hemorrhage, necrosis, loss of motor neurons and histologic abnormalities confirming the method's effectiveness.



BRAZILIAN CONGRESS ON STEM CELLS AND CELL THERAPY



October 3 - 6, 2012 - São Paulo - Brazil

Certificate

The ABTCEL Associação Brasileira de Terapia Celular, fgi
ISSCR International Society for Stem Cell Research, certify that

Villanova JA, Fracaro L, Silva AJ, Rebelatto CLK, Brofman PRS Dittrich RL, Moura SAB

have participated on the 7th CBCTC Brazilian Congress on Stem Cells and Cell Therapy, October 3rd to 6th, held in São Paulo, Brazil, as

Authors.

Title: USE OF ADIPOSE DERIVED STEM CELLS IN RATS SUBJECTED TO SPINAL CORD COMPRESSION, WITH AND WITHOUT
CORTICOSTEROID TREATMENT

São Paulo, October 6th, 2012.



Lygia da Veiga Pereira
President



Valéria Bezerra de Carvalho
Vice-President



Rosália Mendez-Otero
ABTCEL President



ABTCEL ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA
DE TERAPIA CELULAR



International Society for Stem Cell Research

USE OF ADIPOSE DERIVED STEM CELLS IN RATS SUBJECTED TO SPINAL CORD COMPRESSION, WITH AND WITHOUT CORTICOSTEROID TREATMENT

Villanova Jr JA^(1,2); Fracaro L⁽¹⁾; Silva, AJ⁽¹⁾; Moura SAB⁽¹⁾; Rebelatto CLK⁽¹⁾; Brofman PRS⁽¹⁾; Locatelli-Dittrich R⁽²⁾

(1) Núcleo de Tecnologia Celular - Pontifícia Universidade Católica do Paraná

(2) Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Paraná

Contact: jose.villanova@pucpr.br

INTRODUCTION

Trauma is a significant cause of mortality in Brazil and around the world, reaching the young population, economically active, often leading to disabling sequelae. Conventional treatment after trauma is the use of corticosteroids, which has no satisfactory results. Stem cells have been used in several preclinical trials for spinal cord injury and may be considered as a promising alternative in the treatment of trauma.

OBJECTIVE

Evaluate the effects of transplantation of adipose derived stem cells (ADSC) in spinal cords and bladders rats with spinal cord compression. Method: ADSC were obtained from human adipose tissue and were cultured for up to third passage. Spinal cord injury in rats was performed with the introduction of a Fogarty catheter nº. 3 in the epidural space T8 and inflating cuff 80µl of saline for five minutes, after laminectomy of T10. The animals were randomized into three groups with 21 animals in each group: control group (A), animals transplanted with culture medium; stem cell group (B) received two applications of ADSC (1.2×10^6 cells/application) seven and 14 days post-injury and corticosteroid group associated with stem cells (C), animals treated with 30mg/kg of methylprednisolone sodium succinate (SSMP) 3 hours after injury and two applications of ADSC. The infusion of cells or culture medium was performed in the cerebrospinal fluid. The evaluations of motor function were weekly using scale Basso-Beattie-Bresneham (BBB) during three months post-injury and histopathologic analyzes were performed after 3 months of the transplant.

RESULTS

In group A, all animals maintained the status paraplegia (zero score - BBB scale) after spinal cord compression and enuresis (Fig. 1 and 3a). In group B, 14.28% of the animals showed improved motor function ($X = 9.3 \pm 0.5$ - BBB scale) and 61.9% of the animals recover urinary continence. In Group C, 19.04% of the animals showed improved motor function ($X = 9.5 \pm 0.6$ - BBB scale) and 71.42% had recovery of urinary continence (Fig. 2 and 3b). The recovery of motor function occurred on average, 20 days after the second application of stem cells and urinary continence on average nine days after the second application. In relation to histological analysis, groups B and C showed a higher percentage of nervous tissue preserved and largest concentration of neuropils compared to group A. Bladder samples from groups A, B and C showed normal histological appearance.

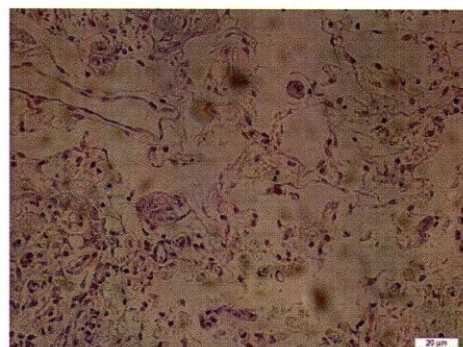


Fig. 1 - CONTROL GROUP: Histological appearance of the cross section of spinal cord white matter presenting spacings compatible with necrotic area.

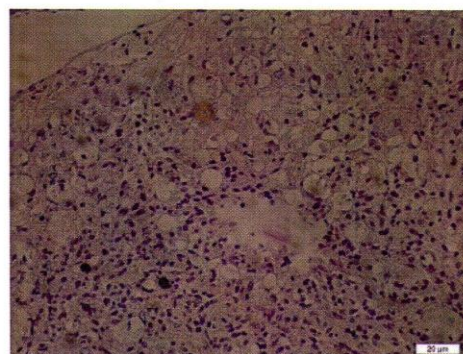


Fig. 2 - STEM CELL GROUP: Histological appearance of the cross section of the spinal cord showing spacings in the white area compatible with necrosis and proliferation of glial cells.

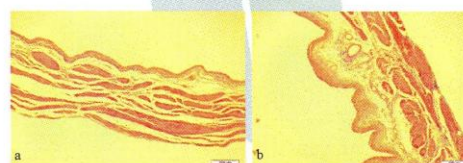


Fig. 3 - CONTROL (a) and STEM CELL (b) GROUPS: Histological appearance of the cross section of bladder showing aspects of normalcy.

CONCLUSION

It was found that the use of ADSC, with or without the SSMP, contributed to clinical improvement and preservation of nervous tissue after spinal cord compression in rats. The bladder emptying prevented histological changes in the bladder.

Financial support: CNPq and Fundação Araucária



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Tecnologia Celular - NTC